

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA KANDIDOVÝCH INFEKČÍ

Disertační práce

Marcela Vejsová

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.

Hradec Králové 2009

Charles University in Prague
Faculty of Medicine in Hradec Králové

LABORATORY DIAGNOSIS OF *CANDIDA* INFECTIONS

Dissertation thesis

Marcela Vejsová

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Vladimír Buchta, Ph.D. Hradec Králové 2009

*„Učenec v laboratoři není jen odborník, je to dítě,
které hledí na vědu jako na pohádku. Vidí ve vědě krásu.“*

Marie Curie-Sklodovská

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat svému školiteli, doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. za veškerou pomoc a čas, který mi věnoval během laboratorního bádání i sepisování disertační práce, jakož i za cenné rady, připomínky a názory, které mi o něco více pootevřely dveře do tajů mykologie.

Velký dík patří paní laborantce Idě Dufkové za technickou pomoc v laboratoři i milá slova a také RNDr. Evě Čermákové za pomoc při statistickém zpracování naměřených dat.

Dále bych ráda poděkovala svému kolegovi a kamarádovi Mgr. Tomášovi Roušarovi, PhD. nejen za cenné rady a pomoc při sepisování práce ale především za psychickou podporu a dávky pozitivní energie, kterými mě zásoboval během celého, nejen doktorského, studia.

Také bych chtěla poděkovat všem kolegům a spolupracovníkům z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové a Lékařské a Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za veškerou podporu a trpělivost, které se mi během celého studia, zejména v závěrečné fázi, dostávalo.

SOUHRN

V současnosti představují kvasinky rodu *Candida* nejběžnější původce oportunních infekcí člověka způsobených houbami, zvláště v nemocničním prostředí. Zatímco celkový podíl kvasinkových infekcí v posledních letech se již nezvyšuje, významně se mění spektrum původců. Vedle dominantního druhu *C. albicans*, přibývá non-*albicans* druhů, zejména *C. glabrata* a *C. tropicalis*. To klade nové a náročnější požadavky na přesnost a rychlost detekce a identifikace houbových původců, včetně podkladů pro výběr adekvátní terapie.

Cílem práce bylo ověřit hodnotu rychlých testů v laboratorní diagnostice *C. albicans* a vypracovat alternativní metodu klasické metody indukce tvorby klíčních hyf v séru. Výsledky pokusů potvrdily, že vzhledem ke své vysoké specifitě i senzitivitě představují chromogenní média a test indukce tvorby klíčních hyf u *C. albicans* jednoduchý, spolehlivý a ekonomický způsob prozatímní identifikaci *C. albicans*, popř. i některých dalších druhů kandid (*C. tropicalis*). Jako plnohodnotnou alternativu k séru u testu klíčních hyf lze použít chemicky definované médium NYP.

Hlavní část experimentů byla věnována optimalizaci metodiky testování citlivosti hub k antimykotikům. E-test a diskový test lze s vysokou spolehlivostí použít pro testování citlivosti houbových izolátů k vorikonazolu a flukonazolu. Disková metoda je vhodnější pro rutinní skríníng, zatímco E-test poskytuje kvantitativní data citlivosti (MIC) srovnatelná pokud jde o shodu výsledků v kategoriích citlivý, citlivý v závislosti na dávce a rezistentní s mikrodilučním bujónovým standardem M27-A2. Navíc u druhů hub citlivých k flukonazolu lze využít stanovení citlivosti k flukonazolu pro predikci *in vitro* citlivosti k vorikonazolu (tzv. surrogate factor).

Součástí práce bylo rovněž vyhodnocení pěti metod pro testování antifungální citlivosti (mikrodiluční bujónová metoda, E-test, diskový difúzní test, Fungitest a ATB fungus) k šesti antimykotikům (flukonazolu, itrakonazolu, ketokonazolu, vorikonazolu, amfotericinu B a flucytosinu). Pro stanovení citlivosti lze použít všechny námi testované metody, ačkoliv u některých antimykotik resp. hub jsou výsledky ovlivněny řadou faktorů. Mezi

nejvýznamnější náleží druh a rozsah koncentrací testovaného antimykotika, kritéria pro stanovení end-point, druh mykotického agens a testovací podmínky.

SUMMARY

Pathogenic *Candida* species represent the most common fungal etiology of human opportunistic infections, particularly among hospitalized patients. After decades of increasing morbidity and mortality of candidiasis, the proportion of *Candida* infections had become to stop and the shift of spectrum of *Candida* species has started to be evident. Apart from a predominating position of *C. albicans*, there is a growing number of non-*albicans* *Candida* species (e.g., *C. glabrata*, *C. tropicalis*) as causative agents of yeast infections.

Mycologists are faced up new challenges of rapid detection and precise identification of fungal isolates including antifungal susceptibility evaluation.

Goal of the study was to confirm usefulness of rapid tests in laboratory diagnostics of *C. albicans* and elaborate an alternative method of classical germ tubes test in serum. The results of experiments showed the use of chromogenic media useful and reliable as well as the test of induction of germ tubes. The comparative tests showed that serum can be replaced with chemically defined NYP medium without loss of high of specificity and sensitivity of the test.

Main part of experiments was focused on optimalization of methodology of *in vitro* antifungal susceptibility testing. Etest and disk diffusion test are very reliable tests for routine testing of susceptibility of yeasts to voriconazole and fluconazole. Disk test is more suitable for screening susceptibility, while Etest provides MIC values which are in agreement with results of a reference microbroth dilution method M27-A2 in terms of categories susceptible, susceptible dose-dependent and resistant. In addition, fluconazole can be used as a surrogate factor to predict voriconazole susceptibility in yeast species susceptible to fluconazole.

Another aim of the study was to evaluate five methods of antifungal susceptibility (microbroth dilution methods, Etest, disk test, Fungitest, and ATB Fungus) to six antimycotics (fluconazole, itraconazole, ketoconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine). All of five methods are useful in mycology laboratory with specific shortcomings due to some factors affecting

their results such as a drug tested, range of drug concentrations tested, feasibility of end-point establishment, yeast tested, and some other test conditions.

SEZNAM ZKRATEK

5FC	5-fluorcytosin, flucytosin
ABCD	Amphocil
ABLC	Abelcet
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AmB	amfotericin B
AST	Antimycotic Sensitivity Test agar
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	bronchoalveolární laváž
CAP	Candida Aspartic Proteinase
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CNS	centrální nervový systém
CS	CandiSelect
CT	počítačová tomografie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUCAST-AFST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee
FLZ	flukonazol
HCA	HiCrome Candida agar
HIV	Human Immunodeficiency Virus
I	intermediární
IC ₈₀ /IC ₉₅	nejnižší koncentrace antimykotika v jamce, kde došlo k alespoň 80% resp. 95% inhibici růstu houby oproti kontrole
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
ITR	itrakonazol
i.v.	intravenózní aplikace léčiva
JIP	jednotka intenzivní péče
KET	ketokonazol
MB	methylenová modř

MFC	minimální fungicidní koncentrace
MH	Mueller-Hintonův agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MOPS	morfolinopropansufonová kyselina
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
NYP	syntetické médium pro indukci tvorby klíčních hyf
MN	malá neshoda
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	polymerázová řetězová reakce
p.o.	perorální aplikace léčiva
R	resistant (rezistentní)
RIA	Radioimmunoassay
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute médium 1640 (růstové médium)
S	susceptible (citlivý)
SAP	Secreted Aspartic Proteinase
SDD	Susceptible Dose Dependent (citlivý v závislosti na dávce)
SGA	Sabouraudův glukózový agar
sp.	species
VOR	vorikonazol
VN	velká neshoda
VVN	velmi velká neshoda
YNB	Yeast Nitrogen Base (základ pro kvasinky s dusíkem)

Zkratky názvů hub

AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFL	<i>Aspergillus flavus</i>
AN	<i>Aspergillus niger</i>
AT	<i>Aspergillus terreus</i>
BC	<i>Blastoschizomyces capitatus</i>
CA	<i>Candida albicans</i>
CG	<i>Candida glabrata</i>
CGU	<i>Candida guilliermondii</i>
CIN	<i>Candida inconspicua</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CKF	<i>Candida kefyr</i>
CLU	<i>Candida lusitanae</i>
CNO	<i>Candida norvegensis</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CPE	<i>Candida pelliculosa</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TA	<i>Trichosporon asahii</i>
TB	<i>Trichosporon beigelii</i>
Tmu	<i>Trichosporon mucoides</i>

OBSAH

1	Úvod	12
2	Teoretická část	14
2.1	Charakteristika houbové buňky	14
2.1.1	Morfologie kvasinek	14
2.1.2	Rozmnožování kvasinek	14
2.1.3	Dimorfismus kvasinek	16
2.2	Patogenita kvasinek	17
2.2.1	Adherence kvasinek	17
2.2.2	Penetrace kvasinek do tkání	18
2.2.3	Růst kvasinek ve tkáni	19
2.2.4	Poškození tkání	19
2.3	Onemocnění způsobené kvasinkami	19
2.3.1	Predispozice a rizikové faktory	20
2.3.1.1	Fyziologické faktory	20
2.3.1.2	Poruchy imunity	20
2.3.1.3	Základní onemocnění	21
2.3.1.4	Imunosupresivní léčba	21
2.3.1.5	Léčba širokospektrými antibiotiky	21
2.3.1.6	Narušení bariéry intravaskulárními vstupy	21
2.3.1.7	Chirurgické výkony a transplantace	22
2.3.1.8	Další predispoziční faktory	22
2.3.2	Dělení kandidózy podle anatomické lokalizace	23
2.3.2.1	Kandidóza kůže	23
2.3.2.2	Kandidóza nehtů	24
2.3.2.2.1	Kandidóza nehtových valů (paronychium)	24
2.3.2.2.2	Kandidóza nehtové ploténky (onychomykóza)	25
2.3.2.3	Orální kandidóza	26
2.3.2.3.1	Akutní pseudomembranózní forma	26
2.3.2.3.2	Akutní erytematózní forma	26
2.3.2.3.3	Chronická forma pseudomembranózní – orofaryngeální	26
2.3.2.3.4	Chronická forma hyperplastická	26
2.3.2.3.5	Chronická forma atrofická	27
2.3.2.3.6	Angulární cheilitida	27
2.3.2.4	Kandidóza gastro-intestinálního traktu	28
2.3.2.5	Kandidóza močového ústrojí	29
2.3.2.6	Vulvovaginální kandidóza	29
2.3.2.7	Plicní kandidóza	30
2.3.2.8	Kandidóza srdce	30
2.3.2.9	Kandidóza centrálního nervového systému (CNS)	31
2.3.2.10	Kandidémie	31
2.3.2.11	Diseminovaná kandidóza	32
2.4	Terapie kandidových infekcí	33
2.4.1	Přehled antifungálních látek	33
2.4.2	Polyeny	35
2.4.2.1	Amfotericin B	35
2.4.2.2	Nystatin a natamycin (pimaricin)	37

2.4.3	Antimetabolity	38
2.4.3.1	Flucytosin (5 fluorcytosin, 5FC)	38
2.4.4	Azolové deriváty	38
2.4.4.1	Imidazolové preparáty	39
2.4.4.2	Triazolové preparáty	40
2.4.5	Echinokandiny	43
2.4.6	Nově vyvíjená antimykotika	45
2.5	<i>Laboratorní diagnostika patogenních hub</i>	46
2.5.1	Mikroskopie	47
2.5.1.1	Nativní preparát	47
2.5.1.2	Louhový preparát	47
2.5.1.3	Preparáty obarvené dle Grama	48
2.5.1.4	Fluorescenční mikroskopie	48
2.5.2	Histologické vyšetření	49
2.5.3	Kultivace	50
2.5.3.1	Kultivační média	50
2.5.4	Druhová identifikace	51
2.5.4.1	Testy založené na biochemické aktivitě kvasinek	51
2.5.4.1.1	Auxanogram	51
2.5.4.1.2	Zymogram	52
2.5.4.1.3	Komerční testy	52
2.5.4.1.4	Chromogenní média	54
2.5.4.2	Testy založené na hodnocení morfologie kvasinek	56
2.5.4.2.1	Test klíčních hyf (germ–tube test)	56
2.5.4.2.2	Hodnocení morfologie kvasinek na nutričně chudých médiích	57
2.5.4.2.3	Hodnocení makromorfologie nejčastěji se vyskytujících kvasinek	57
2.5.5	Imunologický průkaz	61
2.5.5.1	Sérologie	61
2.5.5.2	Průkaz antigenu	61
2.5.6	Molekulárně biologické metody	63
2.6	<i>Testování antifugální citlivosti</i>	63
2.6.1	Agarové difúzní metody	64
2.6.1.1	Diskový difúzní test	64
2.6.1.2	Gradientový difúzní test	65
2.6.2	Agarová diluční metoda	66
2.6.3	Bujónová diluční metoda	66
2.6.4	Komerční soupravy	68
2.6.4.1	Fungitest (BioRad, Francie)	68
2.6.4.2	ATB Fungus 3 (Biomerieux, Francie)	69
3	Cíle a hypotézy	71
3.1	<i>Rychlé diagnostické testy</i>	71
3.2	<i>Testování antifungální citlivosti</i>	71
4	Experimentální část	72
4.1	<i>Houbové kmeny</i>	72
4.1.1	Referenční kmeny	72
4.1.2	Testované kmeny	72
4.2	<i>Média</i>	75

4.2.1	Kultivační média	75
4.2.2	Média pro indukci tvorby klíčních hyf	75
4.2.3	Chromogenní média	75
4.2.4	Média pro testování antifungální citlivosti	75
4.3	<i>Antifungální látky</i>	76
4.3.1	Diskový difúzní test	76
4.3.2	E-test	76
4.3.3	Mikrodiluční bujónová metoda	76
4.4	<i>Metody</i>	77
4.4.1	Druhovú identifikace kvasinek	77
4.4.1.1	Auxanogram	77
4.4.1.2	Hodnocení morfologie na kukuřičném agaru	77
4.4.2	Test klíčních hyf	77
4.4.3	Testování antifungální citlivosti	78
4.4.3.1	Příprava suspenzí	78
4.4.3.2	Diskový difúzní test	78
4.4.3.3	E-test	78
4.4.3.4	Mikrodiluční bujónová metoda	79
4.4.3.5	ATB fungus	79
4.4.3.6	Fungitest	79
4.4.3.7	Interpretační kritéria a statistické hodnocení testů citlivosti k antifungálním látkám	80
5	Výsledky	83
5.1	<i>Rychlé diagnostické testy</i>	83
5.1.1	Test tvorby klíčních hyf	83
5.1.2	Růst na chromogenních médiích I	84
5.1.3	Růst na chromogenních médiích II	86
5.2	<i>Testování antifungální citlivosti</i>	87
5.2.1	Srovnání diskového difúzního testu a E-testu pro testování citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu	87
5.2.2	Srovnání mikrodiluční metody, E-testu, diskového difúzního testu, Fungitestu a ATB fungus testu pro testování citlivosti k flukonazolu, itrakonazolu, ketokonazolu, vorikonazolu, amfotericinu B a flucytosinu	94
6	Diskuze	108
7	Závěry	119
8	Seznam literatury	120
9	Seznam tabulek, grafů a obrázků	129
10	Příloha	133

1 ÚVOD

Kvasinky patří v současnosti, mezi nejčastější původce oportunních infekcí houbového původu. V etiologii dominují druhy rodu *Candida*, zvláště *C. albicans*. Klinicky představují jednak relativně nezávažné slizniční a kožní formy, jednak život ohrožující systémové kandidózy, se kterými se setkáváme zvláště v nemocničním prostředí u imunologicky oslabených pacientů. Závažnost celkových infekcí vyvolaných těmito mikromycetami zvyšuje jejich vysoká mortalita, která se běžně pohybuje mezi 20 až 50% (Gumbo et al. 1999, Viscoli et al. 1999, Steinbach 2005). Proto včasná a přesná diagnostika kvasinkových infekcí nabývá na stále větším významu a to především vzhledem k nárůstu incidence v posledních desetiletích. Příčin tohoto vývoje je několik: na jedné straně se zvyšuje povědomí o jejich výskytu a spolehlivost mykologické diagnostiky, na straně druhé přibývá počet pacientů s predispozičními a rizikovými faktory (širokospektrá antibiotika, kortikosteroidy, cytotoxická terapie, transplantace a složité, zejména břišní, operace, hemodialýza, diabetes mellitus, hormonální antikoncepce, HIV infekce, atd.), které je činí vůči kvasinkám snadněji zranitelnými. Od 90. let lze pozorovat významný trend rostoucího podílu méně do té doby běžných, tzv. non-*albicans*, druhů kandid (především *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. krusei*) (Odds 1996, Krčméry a Kovačičová 2000, Chang et al. 2008). Předpokládá se, že jednou z možných příčin změny druhového spektra kandidózy, je široké používání antifungálních léků, zejména flukonazolu, dále narůstající počet katetrizovaných a transplantovaných pacientů (Fridkin a Jarvis 1996, Patel a Paya 1997). Samostatným problémem jsou nozokominální nákazy kvasinkového původu, zejména infekce krevního řečiště, u kterých představují kandidy společně s grampozitivními koky a gramnegativními tyčkami, jednoho z hlavních původců, navíc vyznačujícího se jednou z nejvyšších mortalit. Tyto infekce jsou téměř vždy spojeny s pobytem alterovaných pacientů v nemocničním prostředí, zvláště na oddělení JIP a mají často iatrogenní původ. Četnost nozokominálních nákaz (zejména kandidémií) signifikantně roste, což potvrzují četné studie (Diekema et al. 2002, Asmundsdóttir et al. 2002).

Včasná diagnóza a zahájení adekvátní antifungální terapie nebo profylaxe hrají klíčovou roli v kontrole a úspěšném zvládnutí kandidových

infekcí. Vzhledem k tomu, že citlivost k antimykotikům jednotlivých druhů kandid se může dost výrazně lišit, její stanovení spolu s druhovou determinací hraje stále významnější roli.

Ve své dizertační práci jsem se zaměřila na možnosti rychlé laboratorní diagnostiky kandid a metody laboratorního testování antifungálních léků a interpretace jejich výsledků směrem do klinické praxe.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika houbové buňky

2.1.1 Morfologie kvasinek

Kvasinky jsou mikroskopické houby vyskytující se za optimálních podmínek jako jednobuněčné eukaryotní chemoheterotrofní organizmy o velikosti cca $1,5 - 5 \times 2 - 15 \mu\text{m}$. Morfologie, včetně tvaru, je dána taxonomickou příslušností a je významně ovlivněna podmínkami kultivace. Tvarově převládá rotační elipsoid, přičemž odchylky mohou jít směrem k sférickému tvaru nebo obráceně k podlouhlé až vláknité formě buňky. Tvar kvasinkové buňky se může měnit i během vlastního vývoje a má, zejména u patogenních druhů, pravidelně dimorfní resp. polymorfní charakter (Fragner 1992, Bednář et al. 1996, Greenwood et al. 1999).

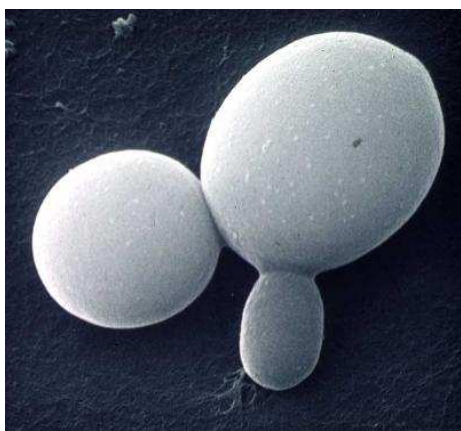
Kvasinkové buňky mají pravé jádro s jadernou membránou, které se dělí mitoticky. Cytoplazma obsahuje mitochondrie a další buněčné organely typické pro eukaryotní buňku. Plazmatická membrána je složená z lipidů, glykoproteinů a houbových sterolů. Hlavním houbovým steroidem v plazmatické membráně je ergosterol. Buněčná stěna obsahuje zejména glukany a manany, avšak specifická je přítomnost chitinu, i když obvykle ve velmi malém množství (Fragner 1992, Bednář et al. 1996, Greenwood et al. 1999).

Podobnost kvasinkové a živočišné buňky je jednou z hlavních překážek při vývoji nových antimykotik. Je tomu tak z důvodu, že antifungální preparát často toxicky ovlivňuje řadu buněk léčeného organismu (játra, ledviny, CNS). Odlišnost buňky hub od buňky bakteriální je hlavním důvodem primární rezistence hub k antibiotikům.

2.1.2 Rozmnožování kvasinek

Kvasinkové buňky (blastospóry, blastokonidie) se množí pučením (Obr. 1), které začíná vytvořením malého zárodečného pupenu blízko jednoho nebo obou pólů mateřské buňky. Jádro buňky se mitoticky dělí a polovina DNA přechází společně s částí fragmentovaných buněčných organel do zvětšujícího se pupenu. Dceřiná buňka se posléze odděluje od mateřské a cyklus začíná znovu. Za určitých podmínek však nemusí dojít k oddělení mateřské a dceřiné

buňky, která se prodlužuje a postupně může vytvářet pseudomycelium, charakterizované řetízky protáhlých blastokonidií. Tento stav je typický pro růst mnoha druhů kvasinek na pevných půdách a je využíván při jejich určování, společně s tvorbou pravých hyf, jako pomocný diagnostický znak. Buňky se prodlužují v podélné ose, aby dosáhly míst, kde ještě nejsou vyčerpány živiny. Okraje kolonií dostávají vláknitý vzhled, mohou vrůstat do agaru. Později se na koncích řetízků vytvářejí shluky blastospór, které se mohou seskupovat do chomáčků, přeslenů nebo nepravidelných větví. U některých rodů nebo kmenů kvasinek se vytváří pravé mycelium, tj. vlákno vznikající příčným dělením – tvorbou přepážky - buněk. Septum se tvoří z cytoplazmatické membrány jako prstencovitá vchlípenina, která prorůstá směrem do středu buňky, až dojde k rozdělení cytoplazmy a oddělení dvou jader. Na myceliu vznikají podobné svazky blastospór jako na pseudomyceliu. V těchto případech jsou označovány jako blastokonidie. U některých rodů (např. *Geotrichum*, *Trichosporon*) se setkáváme s rozpadem hyf na válečkovité pravidelné buňky označované jako artrokonidie.



Obrázek 1. Pučící blastospora

http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/images/calbsem.jpg

U kvasinky *C. albicans* dochází za určitých podmínek k tvorbě silnostěnných chlamydospór (Obr. 2), dormantních buněk, odolných k faktorům vnějšího prostředí. Předpokládá se, že jejich vývoj je výsledkem endogenního metabolismu. Mladé chlamydospory mají schopnost germinace, starší však tuto schopnost ztrácejí v souvislosti s morfologicko-biochemickými změnami (ztluštění stěny, akumulace lipidů). Obecně lze chlamydosporu považovat za zvláštní vegetativní formu, která se může vytvořit během životního cyklu

C. albicans a jejíž funkce není dosud přesně vymezena (Tomšíková 2000). Vlastnosti tvorby chlamydospor *C. albicans* se využívá k jejímu odlišení od ostatních druhů kvasinek.



Obrázek 2. Chlamydospory *C. albicans* na kukuřičném agaru (400x)

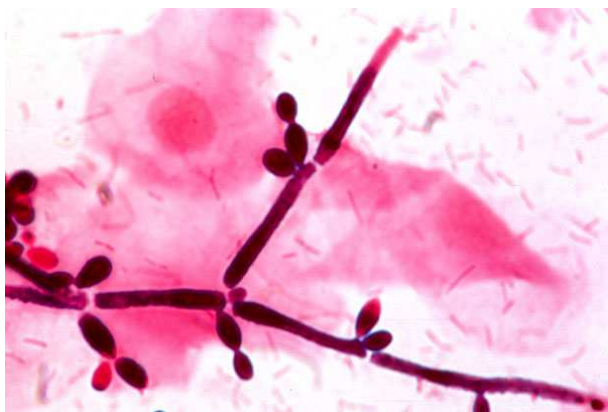
<http://www.christinas-home-remedies.com/image-files/candida-albicans-picture1.jpg>

Některé druhy kvasinek se mohou pohlavně rozmnožovat. Spojením dvou vzniká samostatné vřesko (ascus) se 2 až 4 askospórami, které se uvolňují po jeho prasknutí do prostředí a dále se rozmnožují opět pučením.

2.1.3 Dimorfismus kvasinek

Jako dimorfismus mikromycet označujeme schopnost vytvářet dvě zcela odlišné vegetativní morfologické formy. S tímto fenoménem se setkáváme u řady hub, včetně kvasinek, které tak přizpůsobují svoji morfologii podmínkám zevního prostředí, včetně lidského těla. Mohou tak růst buď jako kvasinky (blastická fáze) nebo ve formě vláknité (pseudomycelium, mycelium).

U řady druhů, původně u původců endemických mykóz (např. *Histoplasma*), je tato schopnost transformace současně považována za virulenční faktor. Například *C. albicans* roste za běžných kultivačních podmínek v blastické kvasinkové formě. Tuto saprofytickou formu je však možno již *in vitro* změnit na myceliální (parazitickou), jestliže se glukóza v kultivačním mediu nahradí glykogenem, škrobem či dextrinem. *In vivo* k tomuto fenoménu dochází při invazi kvasinky do tkáně.



Obrázek 3. Dimorfismus *C. albicans* (Gramovo barvení, 1000x)

<http://overcomingcandida.com/mycology/candida200.jpg>

2.2 Patogenita kvasinek

Kvasinky mohou různými způsoby projevit svou patogenitu, která jim umožňuje invazi tkání hostitele a přežití v jeho vnitřním prostředí. Předpokládá se, že patogenní potenciál kandid je multifaktoriální povahy, tedy že žádný z faktorů není sám o sobě obvykle postačující, ale také absolutně nezbytný pro vyvolání patologických projevů (Kotzya a Tomšíková 1995, Bednář et al. 1996).

K rozvoji onemocnění jsou podstatné tyto vlastnosti – schopnost adherence, schopnost penetrace do tkání, schopnost růstu a množení ve tkáni a následné poškození tkáně.

2.2.1 Adherence kvasinek

Schopnost kvasinek adherovat na sliznici či kůži hostitele je hlavním předpokladem pro kolonizaci dané lokality. Při procesu adherence musí být kvasinková buňka schopna se zachytit a udržet na různých biologických površích jako jsou buňky epitelu a endotelu, event. také na nebiologických materiálech, jako např. plastické hmoty, umělé srdeční chlopně, cévní a močové katétry, zubní protézy atd. Patogenní druhy kandid adherují rychleji a silněji než ostatní. Dobrá adhezenční schopnost byla prokázána především u *C. albicans*, relativně méně u jiných druhů, jako je *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. parapsilosis* (Tomšíková 1990).

Adherence je umožněna tvorbou fibrilární vrstvy na povrchu buněk kandid, která vzniká jako reakce na vysokou koncentraci cukrů. Tato vrstva se skládá se z manoproteinů a fibrily představující struktury podobné bakteriálním

fimbriím částečně chrání kvasinkovou buňku před fagocytózou. Klíčící buňky *C. albicans* adherují lépe a ve větším množství než blastokonidie, protože dochází ke zvětšení povrchové plochy kvasinky a rovněž ke změnám v povrchových složkách (adhezivní složka je koncentrovaná na povrchu klíčících hyf - *germ tubes*). Jedním z hlavních kandidátů na receptor kandid na hostitelských buňkách je fibronektin. Jedná se o glykoprotein, který se v rozpustné formě nachází v plazmě a různých tělních tekutinách. Vlastní adheze k fibronektinu je pak zprostředkována fibrinogenem (Tomšíková 1990).

Adheze kandid na epitely je ovlivněna také fyzikálními a chemickými vlivy, jako jsou teplota, pH nebo CO₂. Např. CO₂ působí nejen na vlastní adhezi, ale mění také strukturu epitelu, čímž pro adhezi připravuje vhodný terén. Adherence může být současně ovlivněna fenoménem zvaným „phenotype switching“ (přesmyknutí). Jde o rychlou, reverzibilní změnu buněk v rozsahu určitého počtu dědičných fenotypů, které lze většinou morfologicky odlišit na agaru. Změna pravděpodobně vzniká rychlou transpozicí mobilních genetických elementů v genomu (Koleta 1995).

V pokusech bylo prokázáno, že adherenci oslabuje až potlačuje extrakce kandid alkáliemi, kyselinami, působení trypsinu, pronázy a chemotrypsinu. Rovněž může být zablokována konkavalinem A, který se váže na adhezíny obsahující manan na povrchu kvasinek (Tomšíková 1990).

2.2.2 Penetrace kvasinek do tkání

Schopnost penetrace do tkání hostitele se uplatňuje po masivním pomnožení kvasinky v kolonizované lokalitě. U dimorfních kvasinek se v takovém případě přednostně vytvářejí vláknité formy, které jsou považovány za invazivní stadia. Přechod kvasinkových blastospor do vláknité formy je mimo jiné stimulován vyšší produkcí prostaglandinu E₂, který současně inhibuje buněčnou imunitní odpověď. Invazivní potenciál kandid může dále ovlivnit neuropeptid beta-endorfin uvolňovaný při stresu a fyzické námaze, pohlavní hormony (především progesteron) a absence interferonu gama (Koleta 1995). S invazivitou je také spojována schopnost germinace u *C. albicans*. Klíčící buňky totiž nejen adherují lépe než blastospory, ale také se mohou pomocí germinace uvolnit z fagocytů po ingesci. V neposlední řadě je invazivita podporována

tvorbou řady enzymů, hlavně proteáz a fosfolipáz. *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a některé další potenciálně patogenní druhy produkují extracelulární kyselé proteázy ze skupiny aspartátových proteáz (CAP = *Candida* Aspartic Proteinase, SAP = Secreted Aspartic Proteinase) (Tomšíková 1990, Bednář et al. 1996). Tato sekreční proteáza je schopna štěpit řadu biologicky významných proteinů, jako je keratin, kolagen, bílkoviny extracelulární matrix a těžké řetězce imunoglobulinů. Keratolytický účinek proteázy přispívá např. k invazi kandid do kůže. Jako prokazatelný patogenní faktor se proteáza uvádí zejména u vaginálních kandidóz. Produkce sekreční proteázy může být, stejně jako adherence, ovlivňována výraznou fenotypovou variabilitou kandid (switching fenomén).

2.2.3 Růst kvasinek ve tkáni

Růst a množení ve tkáni vyžaduje, aby kvasinka snášela fyzikální a chemické podmínky prostředí (pH, teplota, redoxní potenciál, ...), aby byla schopna využít dostupné živiny a dokázala překonat imunitní systém hostitele.

2.2.4 Poškození tkání

Poškození tkání je způsobeno jednak přímou invazí, jednak metabolity invadující kvasinky a rovněž toxickým účinkem zánětlivé reakce. Za příhodných podmínek jsou kvasinky schopny tvořit velké masy buněk, které mohou vyvolat až obstrukci a poškození např. střeva, bronchů nebo ledvin. Při prorůstání kvasinek cévami pak může následně docházet ke vzniku trombů a nekróz (Bednář et al. 1996).

2.3 Onemocnění způsobené kvasinkami

Jako mykózy označujeme pravá infekční onemocnění vyvolaná mikromycetami, která jsou charakterizovaná kolonizací, následnou proliferací, invazí a případnou diseminací v tkáních nebo tělních tekutinách hostitele, mající za následek jeho poškození.

Kandidóza je označení pro mykotické onemocnění způsobené kvasinkami rodu *Candida*, kdy je kvasinka detekována v místech, která jsou jinak sterilní, nebo se v nich kvasinky obecně nevyskytují. Průběh kandidové

infekce je akutní, subchronický nebo chronický. V etiologii převažuje *C. albicans*, ale v současnosti se stále více prosazují také non – *albicans* druhy, zejména *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* a *C. parapsilosis* (Odds 1996, Krčméry a Kovačičová 2000, Chang et al. 2008).

2.3.1 Predispozice a rizikové faktory

Existuje mnoho příčin, které mohou přispívat k přeměně kandidy z neškodného komenzála v invazivního patogena. Tyto příčiny lze rozdělit na vnitřní (endogenní), které zahrnují onemocnění a stavy, jež oslabují nemocného a snižují jeho obranyschopnost, a na vnější (exogenní) související s léčebnými a diagnostickými zásahy.

2.3.1.1 Fyziologické faktory

Důležitou úlohu hraje věk pacienta, zejména jeho extrémy. Ohroženi jsou jednak novorozenci (především předčasně narození a/nebo s nízkou porodní váhou), na druhé straně staří lidé, u kterých se projevuje určitá opotřebovanost imunitního systému.

Dalším fyziologickým rizikovým faktorem je gravidita spojená s výraznými hormonálními změnami v organismu ženy. Klinické příznaky vulvovaginální kandidózy má v těhotenství až 80% ze všech kvasinkami kolonizovaných žen, mimo graviditu pouze 30% (Koleta 1995). Podobný obraz klinických příznaků je možno sledovat u žen užívajících hormonální antikoncepci s vyšším obsahem estrogenů.

Vznik povrchových kandidóz ovlivňuje také anatomická lokalizace. Infekce postihují především místa s vlhkou zapádkou, jako jsou meziprstní prostory na nohou a rukou, podpažní jamky, třísla a u žen kožní záhyby pod prsy.

2.3.1.2 Poruchy imunity

Je-li oslabena obranyschopnost, podléhá takto postižený jedinec téměř jakékoliv infekci, tedy i mykotické. Defekty imunitního systému mohou být na úrovni lokální (fagocytóza, porucha tvorby myeloperoxidázy) i systémové, např. dysfunkce T – lymfocytů či snížená produkce protilátek (Dlouhý et al. 1993, Tomšíková 1996, Vincent et al. 1998, Greenwood et al. 1999).

2.3.1.3 Základní onemocnění

Mezi onemocnění, která výrazně oslabují pacienta, a která mohou být komplikována systémovou mykózou, řadíme jednak onemocnění endokrinní a metabolická, jako např. diabetes mellitus, uremický syndrom, hypothyreózu, různá nádorová onemocnění, zvláště hemoblastózy či lymfomy (Dlouhý et al. 1993, Vincent et al. 1998). Patří sem také stavy spojené s neutropenií, zvláště hlubokou a dlouhodobou, která může být ještě zhoršena terapií antibiotiky, zvláště aminoglykosidy. Důležitým rizikovým faktorem jsou rovněž těžké akutní a chronické infekce jako např. tuberkulóza a v poslední době především HIV. K predisponujícím faktorům lze přiřadit také chronická onemocnění jater a alkoholismus.

2.3.1.4 Imunosupresivní léčba

Imunosupresivní terapie je indikována v případech, kdy je potřeba potlačit imunitní reakci pacienta, jako je tomu např. při transplantacích, implantacích nebo u některých autoimunitních postižení. Imunosupresivně působí též terapie zaměřená na zvládnutí maligních novotvarů, při které jsou podávána cytostatika, kortikoidy nebo je aplikováno ionizující záření. V každém z uvedených případů se jedná o různě silné potlačení protilátkové a zvláště pak buněčné imunity, a pacient je vystaven riziku vzniku závažné sekundární infekce (Tomšíková 1996, Vincent et al. 1998).

2.3.1.5 Léčba širokospektrými antibiotiky

Širokospektrá antibiotika mění a porušují jednak rovnovážný stav (eubiózu) mezi makroorganizmem a fyziologickou bakteriální flórou na sliznicích, jednak mohou oslabovat některé funkce imunitního systému (fagocytóza). Následkem toho dochází dysmikrobii, může být narušena slizniční bariéra a dojít k přerůstání kandid, popř. k jejich parazitární konverzi, tj. přechodu z blastické do vláknité formy.

2.3.1.6 Narušení bariéry intravaskulárními vstupy

Mezi další významné rizikové faktory je řazeno zavedení žilních a močových katétrů, parentální výživa a kontaminované infuzní roztoky. Je popisováno, že např. při zavedení dlouhodobých intravenózních katétrů dochází k fungémii asi ve 20% případů do čtyř týdnů, u krátkodobých katétrů do několika

dní, a to v až v 80% (Tomšíková 1996). Do parentální výživy se kandidy dostávají hlavně při přípravě těchto roztoků a to i ve vakuovém systému. Infuzní roztoky mohou být také kontaminovány během přípravy nebo transportu z kůže personálu, nejčastěji se však jedná o kanylu kontaminovanou kvasinkami z kůže pacienta během jejího zavedení (Tomšíková 1996, Vincent et al. 1998).

2.3.1.7 Chirurgické výkony a transplantace

Mezi významné rizikové faktory patří transplantace orgánů a kostní dřeně, které jsou pravidelně komplikovány mykotickou infekcí. Rozvoj těchto infekcí je umožněn hlavně prodlouženým obdobím intenzivní léčby, která potlačuje imunitní odpověď příjemce z důvodu, aby se zamezilo odloučení transplantátu. Funkce T a B – lymfocytů je nejvíce oslabena v prvních třech měsících po transplantaci. V tomto období se také houbové infekce objevují nejčastěji a jsou jednou z hlavních příčin úmrtí transplantovaných pacientů (Tomšíková 1996). Dalším z chirurgických faktorů zvyšujících riziko invazivní mykózy jsou abdominální operace vzhledem ke střevnímu rezervoáru kvasinek. Neméně významným rizikovým faktorem vzniku mykóz jsou traumata, zvláště popáleniny a tržná, zhmožděná poranění, která ve většině případů bývají kontaminována prachem z prostředí, ve kterém vznikla. Přestože se z mykologického hlediska většinou jedná o postižení vláknitými mikromycetami, lze se setkat i s kandidami. Vzhledem k tomu, že při zvláště rozsáhlých traumatických postiženích dochází nutně k oslabení imunity a často jsou podávána i širokospektrá antibiotika, mohou se u těchto případů kandidy aktivovat z endogenních zdrojů.

2.3.1.8 Další predispoziční faktory

Mezi další rizikové faktory patří např. protrahovaný stres. Za spouštěcí mechanismus invazivní infekce se zde považuje vylučování neuropeptidu β -endorfinu, který pozitivně ovlivňuje invazivitu kandid (Dlouhý et al. 1993, Kotyza a Tomšíková 1995).

Vedle stresu je dalším významným rizikem podporujícím vznik mykózy užívání drog, zvláště při jejich intravenózní aplikaci často prováděné nesterilními nástroji. Navíc zde hraje důležitou roli oslabení imunitního systému samotnou drogou.

U všech stavů spojených s pobytem v léčebném zařízení hraje určitou predispoziční roli také časový údaj. Čím závažnější je stav pacienta nebo jeho intenzivní terapie, tím kratší časový úsek je nutný pro osídlení kandidami a jejich masivní pomnožení. Za časovou hranici kolonizace se považují 3 dny u pacientů na JIP. Ke kolonizaci sliznic kvasinkami u ostatních nemocných dochází při jejich hospitalizaci delší než 20 dnů (Vincent et al. 1998).

2.3.2 Dělení kandidózy podle anatomické lokalizace

2.3.2.1 Kandidóza kůže

Kožní projevy vyvolané kandidami bývají nejčastěji lokalizovány v intertriginózních místech, např. v axilách, tříslech, na perineu, pod prsy a u dětí pod plenkami (Kubec 1983, Fragner 1984, Greenwood et al. 1999). Jejich výskyt je podporován vlhkou zapáříkou (potem, cukrovými roztoky, saponáty, mýdly, louhy, ...), macerací kůže a nízkou tenzí kyslíku. Onemocnění nejčastěji probíhá pod obrazem interdigitální mykózy, na rozdíl od dermatofytózy spíše rukou než v meziprstních prostorech nohou. Eroze působené proliferací houby v kůži postihují téměř vždy třetí interdigitální prostor, vzácně i jiné (Fragner 1984). Toto onemocnění je charakterizované mokvajícimi zánětlivými sytě červenými papulami, od okolí ohraničenými bílým límečkovitým lemem macerované epidermis a obsahují epitelie, fibrin, leukocyty a mycelium. V sousedství bývají četné satelitní projevy, které začínají jako izolované vezikuly až buly, po jejichž prasknutí zůstávají ostře ohraničené mokvající eroze (Kubec 1983, Fragner 1984). Ze subjektivních příznaků je nejčastější svědění, pálení až bolestivost postižené kůže.



Obrázek 4. Interdigitální kandidóza

http://ashi.myweb.uga.edu/candiasis_basic2.jpg

2.3.2.2 Kandidóza nehtů

2.3.2.2.1 Kandidóza nehtových valů (paronychium)

Vedle posttraumatického postižení se kandidová paronychia vyskytují u osob, které jsou často v kontaktu s vodou (ženy v domácnosti, ošetřovatelky, čišníci, servírky, výčepníci, umývačky nádobí, zaměstnanci prádelny), nebo potravinářskými polotovary a produkty bohatými na sacharidy (pekaři, cukráři, pracovníci v konzervářském průmyslu) (Kubec 1983, Fagner 1984, Greenwood et al. 1999).

Klinické projevy jsou charakterizovány fialově červeným zduřením nehtového valu, ztrátou kutikuly a odchlípnutím od nehtové ploténky. Při mírném tlaku na nehtový val vytéká ze štěrbiny pod valem malé množství hustého bělavého hnisu. Onemocnění mívá chronický ráz s remisemi a může postihnout kterýkoli prst. Nejčastěji však bývá postižen ukazovák a prostředník. Pravidelně se vyskytuje společně s bakteriemi, hlavně rodu *Pseudomonas* a *Staphylococcus*.



Obrázek 5. Paronychium

<http://dic.academic.ru/pictures/enwiki/80/Paronychia.jpg>

2.3.2.2.2 Kandidóza nehtové ploténky (onychomykóza)

Kvasinková infekce nehtové ploténky může vzniknout jednak primárně, bez předcházejícího poškození okolních tkání, jednak sekundárně jako následek chronického zánětu nehtového valu (Kubec 1983). Projevuje se bělavými, šedavými nebo slabě nazelenalými či namodralými skvrnami na nehtové ploténce, která se nijak nápadně nerozpadá ani netřepí (na rozdíl od onychomykóz vyvolaných dermatofyty). Nehet se obvykle neztlušťuje (spíše ztenčuje) a v případě primárního poškození postupuje od volných okrajů nehtů směrem ke kořeni. Pokud však onychomykóza vznikne druhotně po zánětu nehtového lůžka, šíří se onemocnění směrem od lunuly k nehtovému okraji. Nehet bývá v takovém případě často význačně deformován. Kandidózou jsou častěji postižovány nehty na ruce než na nohou (Fragner 1984).



Obrázek 6. Kandidová onychomykóza

http://z.hubpages.com/u/374544_f520.jpg

2.3.2.3 Orální kandidóza

Orální kandidóza je jedním z častějších postižení ústní sliznice, zejména u osob s lokální a systémovou predispozicí. Její klinické projevy jsou velmi pestré a průběh může být akutní nebo chronický. Z toho hlediska lze orální kandidózu rozdělit do následujících šesti skupin (Kubec 1983, Slezák et al. 1997).

2.3.2.3.1 Akutní pseudomembranózní forma

Vzniká náhle, projevuje se tvorbou bělavých, setřením odstranitelných povlaků – pseudomembrán. Nejčastěji postihuje tvrdé a měkké patro, hřbet jazyka, bukální a labiální sliznici, z níž přechází do koutků. Ústní sliznice je citlivá, palčivá až bolestivá (Kubec 1983, Fragner 1984, Slezák et al. 1997, Tomšíková 1997).

2.3.2.3.2 Akutní erytematózní forma

Jde o bezpovlakovou formu vznikající jako typický následek dysmikrobie, nejčastěji v důsledku léčby širokospektrými antibiotiky. Projevuje se vznikem bolestivých, difúzně zarudlých ploch sliznice. Hojí se rychle a často odeznívá i spontánně (Kubec 1983, Slezák et al. 1997).

2.3.2.3.3 Chronická forma pseudomembranózní – orofaryngeální

Jedná se o velice závažnou formu hrozící diseminací zejména u imunodeficientních jedinců. Ústní dutina je postižena tvorbou rozsáhlých kandidových ložisek přecházejících do orofaryngu. Zhojení či další progrese kandidózy závisí na celkovém stavu pacienta a včasném zahájení etiotropní terapie (Slezák et al. 1997).

2.3.2.3.4 Chronická forma hyperplastická

V tomto případě jde o méně častou formu chronické kandidózy, vyskytující se zejména u jedinců s imunodeficity. Klinicky ji charakterizují tuhá bělavá ložiska pevně lpící ke spodině, nejčastěji na bukální sliznici, hřbetu a hranách jazyka. Svými projevy připomíná leukoplakii (Kubec 1983, Slezák et al. 1997).



Obrázek 7. Chronická forma hyperplastická

<http://img.tfd.com/mosby/thumbs/500051-fx4.jpg>

2.3.2.3.5 Chronická forma atrofická

S touto formou se setkáváme u jedinců, kteří nosí zubní protézu, nebo u dětí s ortodontickými aparáty. Postižena bývá zvláště ústní sliznice, která je v kontaktu s protézou resp. ortodontickým aparátem. Z toho důvodu bývá nejčastější lokalizací tvrdé patro a hřbet jazyka, kde je sliznice výrazně ohraničeně zarudlá. U části pacientů (většinou v důsledku chronického dráždění) je patrová sliznice papilomatózně zbytnělá. Při této formě kandidózy je značná tendence k recidivám, neboť snímatelná zubní protéza (ortodontický aparát) se stává rezervoárem infekce (Kubec 1983, Slezák et al. 1997).

2.3.2.3.6 Angulární cheilitida

Jedná se o chronické či akutní postižení sliznice a kůže v oblasti ústních koutků. Projevuje se oboustranným vznikem zarudlého ložiska s centrální bolestivou ragádou. Palčivost či bolest se zhoršují při otevírání úst a často nutí postiženého k olizování bolestivých koutků. Důležitými patogenetickými faktory jsou v těchto případech např. nevhodná zubní protéza, hluboké kožní záhyby v ústních koutcích či prohloubená nosolícní rýha (Kubec 1983, Slezák et al. 1997).



Obrázek 8. Angulární cheilitida

<http://www.doctorspiller.com/images/OralAnatomy/AngularCheilitis.jpg>

2.3.2.4 Kandidóza gastro-intestinálního traktu

Při kandidóze gastro-intestinálního traktu je nejčastěji zasažen jícen. Může jít jak pouze o povrchové poškození, tak může infekce pronikat hluboko do tkáně jícnu, kde lze kromě blastospor najít i invazivní myceliová vlákna. Kandidové ezofagitidy doprovázejí taková závažná onemocnění jako je AIDS, různé další defekty imunity nebo vysilující celková onemocnění. U 70% postižených se vyskytují současně i příznaky orální kandidózy, vzhledem k tomu, že se mikroflóra dutiny ústní a jícnu v 67% shoduje (Tomšíková 1999). Kandidová ezofagitida je většinou doprovázená nevolností, nechutenstvím, zvracením, hemetemezou, dysfagií a pálením až bolestí za sternem.

Izolované poškození žaludku kandidami nebývá příliš časté a infekce se sem dostává nejčastěji prorůstáním z oblasti jícnu do subkardiálního prostoru (Tomšíková 1997). Také u tohoto typu kandidózy většinou chybí charakteristické klinické příznaky. Pacienti trpí bolestmi v horní části břicha, zvracením, při masivní infiltraci sliznice kvasinkami se může objevit i hematemeza. U rizikových pacientů však může být infekce zavlečena do žaludku také např. kontaminovanou potravou (Tomšíková 1997).

Ve střevě člověka žijí různé druhy kvasinek jako komenzálové. Jejich množství u zdravého člověka kolísá od 10^2 cfu/ ml do 10^4 cfu/ ml (Tomšíková 1997). Narušením vnitřní rovnováhy (např. širokospektrými antibiotiky, kortikosteroidy atd.) se však může jejich počet na úkor bakterií zvýšit, což může vyústit až do kandidové infekce. Příznaky jsou i zde většinou nespecifické. Často se stává, že je kandidová enteritida diagnostikována až při pitvě. V

histologickém vyšetření je možné najít ulcerující, nekrotizující, hemoragicko-hnisavý zánět. Kvasinky tvoří v mezibuněčných prostorech střevních krypt ložiska a jejich mycelium proniká až do submukózy. Zde může být atakován cévní systém, jehož prostřednictvím je dána možnost vzniku systémové kandidózy, diseminací ze základního ložiska (Tomšíková 1997).

2.3.2.5 Kandidóza močového ústrojí

Ke kandidové infekci močového ústrojí může dojít buď prorůstáním kvasinek ze sousedních orgánů nebo hematogenní cestou. Nejčastěji je však tato infekce pozorována u nemocných se zavedeným močovým katétrem. V takovém případě infekce zůstává většinou lokalizována a vymizí, jakmile je katétr vyjmut. Přetrvává-li infekce dále, projevuje se stejně jako bakteriální cystitida, a to častým nucením na moč, dysurií a vzácně i hematurií. Kandidy kromě cystitidy, uretritidy či asymptomatické kandidurie mohou vyvolat i závažnější postižení horních částí močového traktu, jako je např. renální kandidóza. Ta vzniká nejčastěji diseminací kandid z primárního ložiska krevní cestou a vyskytuje se u více než 80% pacientů s kandidovou sepsí (Dlouhý et al. 1993). Kvasinky je možno najít v glomerulech, tubulech i intersticiu. Vznikají mnohočetné abscesy, později i nekrózy papil a aglomeráty kvasinek. Tyto hmoty mohou ucpat duté systémy uropoetického traktu a způsobit tím akutní renální insuficienci (Dlouhý et al. 1993, Filka et al. 1997). Pokud jde o množství zachycených kvasinek při kultivaci, tak se za signifikantní hodnotu kandidových infekcí močových cest, v nepřítomnosti katétru, považuje hodnota více než 10^4 cfu/ml (Greenwood et al. 1999, Dorko et al. 2000). V případě nálezů kvasinek v moči u pacienta v septickém stavu však mohou být pro potvrzení systémové kandidózy signifikantní i nižší hodnoty (10^2 cfu/ml).

2.3.2.6 Vulvovaginální kandidóza

Kandidové infekce pochvy patří k nejčastějším mykotickým infekcím, postihující více jak dvě třetiny sexuálně aktivní ženské populace. Toto onemocnění přechází v některých případech do chronicity, což je podporováno mnoha faktory jako je gravidita, hormonální antikoncepce, léčba širokospektrými antibiotiky, diabetes mellitus, lokální alergie, AIDS, dieta s vysokým obsahem cukru či v neposlední řadě životním stylem a osobní

hygienou – těsné nylonové prádlo (zapáčka v oblasti zevních rodidel), poševní tampóny, deodoranty, mýdla, spreje, parfémované toaletní potřeby, chlorovaná voda... (Koleta 1995, Tomšíková 1998, Špaček et al. 2008). Mezi charakteristické příznaky akutní formy onemocnění patří typický bílý, sýrovitý, hrudkovitý výtok vytvářející na sliznici pochvy bílé povlaky. Je doprovázený svěděním, pálením, bolestí, zduřením pohlavních orgánů, dysurií, nebo dysparenurií (Koleta 1995, Tomšíková 1998, Špaček et al. 2008). Tyto projevy infekce mohou být velmi mírné, nebo naopak silně intenzivní. U chronické formy převládají subjektivní potíže žen (pálení, svědění), často na pozadí chudého objektivního, včetně mikrobiologického, nálezu.

2.3.2.7 Plicní kandidóza

Tato forma orgánové infekce kvasinkami se nejčastěji klinicky manifestuje vysokými teplotami, kašlem a produkcí mukoidního želatinózního sputa s masivním obsahem kandid. Jako další časté symptomy bývají popisovány dyspnoe a bolest na hrudníku (Kubec 1983, Sákra et al. 2000). Postižení dýchacího systému může probíhat pod obrazem chronické bronchitidy, pneumonie nebo plicního abscesu u dospělých a pod obrazem obstrukce bronchů a plicního kolapsu u dětí (Tomšíková 1999). Vhodnými metodami pro diferenciální diagnostiku jsou bronchoalveolární laváž s mykologickým a bakteriologickým vyšetřením a CT hrudníku nebo rentgen plic. Z invazivních diagnostických metod se nabízí možnost otevřené plicní biopsie. Přestože je tato metoda považována za velmi průkaznou, běžně se neprovádí vzhledem k obavě z možné diseminace procesu a potenciálním komplikacím u hematologicky nestabilních pacientů. Na rentgenu plic nacházíme nodulární infiltráty. Z hlediska brány vstupu může jít o oportunní infekci vyvolanou v průběhu kandidémie, nebo může být do plic zavlečena při umělé plicní ventilaci nebo aspirací kandidových hmot z orofaryngu (Chládková et al. 1996, Tomšíková 1999).

2.3.2.8 Kandidóza srdce

Kandidová endokarditida je charakterizovaná většinou postižením srdečních chlopní nejčastěji v souvislosti s jejich transplantacemi či umělými náhradami, dále diseminací z kontaminovaných intravenózních katétrů, nebo při

implantaci pacemakerů (Kubec 1983, Dlouhý et al. 1993, Tomšíková 1999, Sákra et al. 2000). Patogenetické příčiny je nutno hledat ve změněné hemodynamice na chlopních, v poškozeném endotelu a v ukládání fibrinu a trombocytů na takto postižených chlopních. Na ně snadno adherují kandidy cirkulující v krvi. Příznaky jsou poměrně necharakteristické a neumožňují odlišení od subakutní bakteriální endokarditidy. Přítomna je horečka, únava, ochablost, anorexie, nové nebo měnící se šelesty, vzácně se pak objevují petechie či tlakové hemoragie. Mortalita tohoto infekčního postižení je značně vysoká, uvádí se i více než 50% (Tomšíková 1999). Je tomu tak především proto, že se jedná o velmi obtížně diagnostikovatelné onemocnění. Vzácně jsou jako postižení srdce popisovány kandidové myokarditidy a perikarditidy (Dlouhý et al. 1993, Sákra et al. 2000).

2.3.2.9 Kandidóza centrálního nervového systému (CNS)

Infekce centrálního nervového systému se projevuje nejčastěji jako meningitida nebo mozkový absces (Tomšíková 1995, Sákra et al. 2000). Těžkou formou kandidové meningitidy bývají postižení hlavně nedonošení novorozenci, vyšší věkové skupiny po operacích v dutině ústní, traumatech v oblasti hlavy a po neurochirurgických operacích. Postižení bývá u těchto pacientů často spojené s cévním katétrem (Tomšíková 1995, Sákra et al. 2000). Diagnostika je složitá, protože se příznaky mykotické infekce v řadě případů neliší od příznaků souvisejících s jiným postižením CNS. Při postmortálním histologickém vyšetření lze na meningách nalézt ztlustění s hnisavým hemoragickým nebo želatinózním exsudátem s maximem na lební bázi, často jsou také přítomny drobné abscesy v mozkovém parenchymu (Dlouhý et al. 1983, Tomšíková 1995).

2.3.2.10 Kandidémie

Jako kandidémie je definován nález kandid v krevním oběhu. Pro potvrzení této diagnózy stačí i jedna pozitivní hemokultura. V praxi se rozlišuje, zda je kandidémie spojená s přítomností nitrožilního katétru, zda jsou či nejsou přítomny klinické příznaky (horečka, třesavka, známky toxického šoku) mykotické infekce, tj. zda se jedná o infekci krevního řečiště.

Jako katéťrová kandidémie se označuje stav, u kterého jednak není zjevný jiný zdroj infekce a jednak se potvrdí infekce buď izolací kandidy z vyjmutého katéťru, nebo – pokud není katéťr vyjmut – je koncentrace kandid v hemokultuře odebrané z katéťru desetkrát vyšší než ze současného odběru z periferní žíly (Haber 1999). Řada těchto kandidémií je přechodná (tranzientní) a ustoupí po odstranění vlastního kontaminovaného katéťru. Takový přechodný nález kvasinek v krvi může souviset např. se stomatochirurgickým zákrokem.

Procento výskytu kandidémií se stále zvyšuje. Kolem roku 1970 byla tato diagnóza pouze řídkým jevem, kolem roku 1990 však již představovala okolo 8-

10% všech nozokomiálních infekcí (Almirante et al. 2005). V současné době zauímají kandidy 4. místo mezi agens způsobujícími hematogenní sepsi (za koaguláza-negativními stafylokoky, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus* spp.) a dosahují nejvyšší mortality (Diekema et al. 2002, Gudlaugsson et al. 2003). Nejvíce případů se objevuje na chirurgických jednotkách intenzivní péče, hematologických a transplantacích odděleních. Kandidémie je nejčastěji výsledkem endogenní kolonizace (ze zažívacího traktu) spíše než exogenního přenosu. Její nebezpečí spočívá v tom, že je obvykle projevem generalizace infekce krevní cestou a s tím souvisejícím vysokým rizikem poškození životně důležitých orgánů (jater, plic, ledvin, mozku) a v důsledku toho spojená s vysokým procentem mortality, které se běžně pohybuje kolem 40 – 50% (Gudlaugsson et al. 2003, Almirante et al. 2005).

2.3.2.11 Diseminovaná kandidóza

Diseminovaná kandidóza se projevuje nekontaktní invazí infekčního agens do orgánů a předchází jí kandidémie. Tato forma infekce postihuje především silně alterované osoby s neutropenií, těžkou formou diabetes mellitus, malnutricemi, tuberkulózou, traumatem nebo po rozsáhlých a složitých chirurgických zákrocích. Diseminovaná kandidóza bývá nejčastějším projevem mykotické infekce u nemocných s leukémií. Poškození je většinou spojeno s užitím intravenózních katéťrů, dlouhodobou intubací a terapií širokospektrými antibiotiky. Klinické projevy jsou rozličné a závisí na tom, který životně důležitý orgán je nejvíce poškozen.

2.4 Terapie kandidových infekcí

Terapie houbových infekcí závisí jednak na klinické formě onemocnění, vlastnostech etiologického agens a na stavu imunity pacienta. Z hlediska terapeutického přístupu můžeme mykotické infekce rozdělit do dvou hlavních skupin.

První skupinu tvoří infekce povrchové (kožní a slizniční), které jsou ve většině případů dobře léčitelné a neohrožují život pacienta. Jelikož tyto infekce mají převážně charakteristický klinický obraz, bývá snadnější i jejich diagnostika včetně volby terapie. K dispozici je široká nabídka lokálních antifungálních preparátů z několika strukturně odlišných skupin. Historicky nejstarší jsou keratolytické preparáty, které mají jen omezený antimykotický efekt a uplatňují se spíše jako podpůrné prostředky usnadňující průnik antimykotika k místu infekce (Buchta et al. 2008). Začátkem 70. let přišla na trh celá řada imidazolových preparátů, které jsou širokospektré a mají podobný farmakologický profil a dodnes jsou hojně využívány v dermatologii. U některých onemocnění, jako např. onychomýkóz, které představují terapeutický problém, je nutné k terapii použít i antimykotikum systémové (Buchta et al. 2008).

Druhou skupinou jsou infekce systémové, které negativně ovlivňují morbiditu a mortalitu zejména imunoalterovaných pacientů (na jednotkách intenzivní péče, hematologických a transplantčních odděleních). Terapie těchto infekcí je komplikovanější a na výběr je podstatně užší spektrum preparátů. Antimykotika používaná k léčbě systémových mykóz musí po aplikaci do léčeného organismu dosáhnout terapeutických koncentrací v různých systémech a orgánech, aby měla žádoucí léčebný efekt.

2.4.1 Přehled antifungálních látek

Antifungální látky specificky působí na houbové organizmy. Většina těchto látek nemá žádný nebo jen zanedbatelný klinický efekt na bakterie a naopak, antibakteriální antibiotika nelze použít pro terapii mykóz (Buchta 2002).

Požadavky na ideální antifungální preparát (dle Chapman et al. 2008)

- Široké spektrum účinku
- fungicidní aktivita

Nízký výskyt rezistencí

- primární (intrinzní) rezistence
- získaná rezistence

Dostupnost v i.v. i p.o. formě

- jednoduché podání

Nízký výskyt nežádoucích účinků

Minimální lékové interakce

Rozumná cena

Formálně lze antimykotika rozdělit do několika skupin podle jejich chemické struktury. Takto je dělíme na antimykotika polyenová, antimetabolity, azolové deriváty, echinokandiny a ostatní (allylaminy, morfoliny, griseofulvin,...). Dále můžeme antimykotika rozlišovat podle charakteru jejich účinku na fungicidní a fungistatická. Přehled nejdůležitějších antifungálních látek a jejich mechanismus účinku shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1. Přehled nejdůležitějších antifungálních látek a jejich mechanismus účinku

Chemická skupina Antimykotikum	Mechanismus účinku
Polyenová antibiotika Amfotericin B Nystatin	fungicidní účinek in vitro; vazba na ergosterol v cytoplazmatické membráně, vznik pórů, únik iontů a bílkovin (enzymů) a přesun jiných molekul do buňky
Azolové deriváty Imidazoly Mikonazol Ketokonazol Triazoly 1. generace Flukonazol Itrakonazol Triazoly 2. generace Vorikonazol Posakonazol Ravukonazol	převážně fungistatický účinek celé skupiny (cidní účinek vorikonazolu na aspergily), společný mechanismus účinku, blokáda enzymatických systémů závislých na cytochromu P450 (inhibice 14- α -demetylázy); inhibice syntézy ergosterolu, poškození funkčnosti plazmatické membrány, zpomalení až zástava růstu
Antimetabolity Flucytosin (5FC)	vstup 5-FC do buněk pomocí membránové cytosin-permeázy; deaminace na 5-fluorouracil; zabudování jako falešný prekurzor do RNA houby na místo cytosinu; blokáda proteosyntézy a thymidylát syntetázy (inhibice syntézy DNA)

Echinokandiny Kaspofungin Anidulafungin Mikafungin	inhibitory buněčné stěny hub (specifické nekompetitivní inhibitory β -(1,3)-glukan syntázy); deplece β -(1,3)-glukanu a osmotická destabilizace buněčné stěny houby
Allylaminy Terbinafin Naftifin	specifická vazba na skvalen epoxidázu; inhibice biosyntézy ergosterolu
Thiokarbamáty Tolnaftát Tolciclát	specifická vazba na skvalen epoxidázu; inhibice biosyntézy ergosterolu
Morfoliny Amorolfin	specifickou vazbu na Δ^{14} reduktázu/ Δ^7 - Δ^8 izomerázu, inhibice biosyntézy ergosterolu
Benzofurany Griseofulvin	interference s mitotickým vřeténkem, inhibice mitózy a poškození syntézy nukleových kyselin

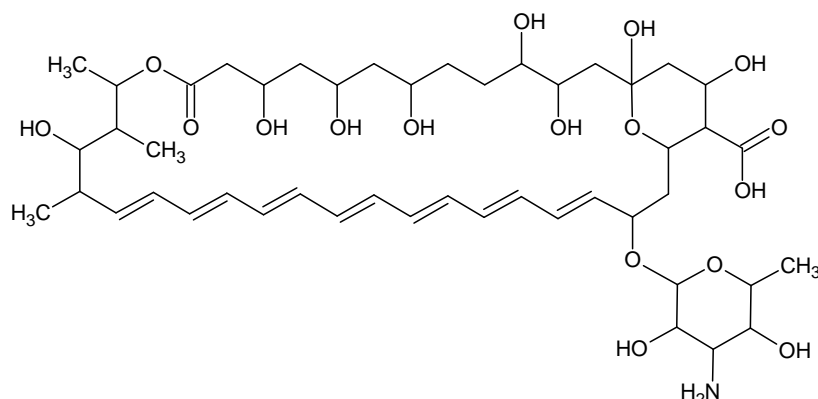
2.4.2 Polyeny

Polyenová antimykotika byla objevena před více než padesáti lety. Bylo popsáno přes 60 antifungálně aktivních polyenů, které jsou strukturně příbuzné s antibakteriálními antibiotiky typu makrolidů (např. erytromycin) (Doležal a Buchta 2006). Do této skupiny látek patří amfotericin B (AmB), nystatin a natamycin. Jediný AmB se používá pro systémovou terapii a dodnes slouží jako „zlatý standard“ systémové antimykotické terapie, k němuž se vztahuje účinnost ostatních antimykotik v dané indikaci.

2.4.2.1 Amfotericin B

Amfotericin B je fungicidní antimykotikum se systémovým účinkem, které zůstává lékem volby u život ohrožujících mykóz, především aspergilózy, systémové kandidózy a kandidémie, mukormykózy, kryptokokózy a endemických mykóz. Do klinické praxe bylo zavedeno v roce 1960. Jde o žlutý krystalický prášek lipofilní povahy, amfoterní, nerozpustný ve vodě. Nejvyššího antimykotického efektu dosahuje okolo neutrálního pH. Je dosud nejúčinnějším antimykotikem s nejširším spektrem účinku a nejmenším výskytem rezistencí. Nevýhodou jsou však jeho nežádoucí a toxické účinky jako horečka, třesavka, nauzea, zvracení, myalgie a vzácně flebitida, alergická reakce či neurotoxicita (křeče, parestázie, poruchy zraku, ...). Při delším podávání může dojít ke ztrátám draselných a hořečnatých iontů, zhoršení funkce ledvin (vzestup urey a

kreatininu), renální tubulární acidóze či anémii a poškození jater (Chapman et al. 2008, Rozsypal 2008).



Obrázek 9. Amfotericin B - chemická struktura

Preparáty:

1. konvenční AmB (deoxycholát)

2. na lipidovém nosiči

- a) AmBisome – AmB inkorporovaný do malých tukových vezikul – lipozomů
- b) Abelcet (ABLC) – AmB vázaný v komplexu s cholesterolovými nosiči
- c) Amphocil (ABCD) – AmB vázaný s tuky ve formě koloidní disperze

Preparáty na lipidovém nosiči jsou rozdílné v některých parametrech (především farmakokinetických), všechny ale významně snižují toxicitu amfotericinu B, proto je lze podávat déle a ve vyšších dávkách. Nevýhodou je finanční náročnost léčby (Pappas 2005, Doležal a Buchta 2006). Jsou indikovány při potřebě vyšších dávek AmB pro dosažení terapeutického efektu, při intoleranci konvenčního AmB, při renálním postižení, či pokud při léčbě konvenčním AmB není zajištěna odpovídající hydratace s doplněním elektrolytů.

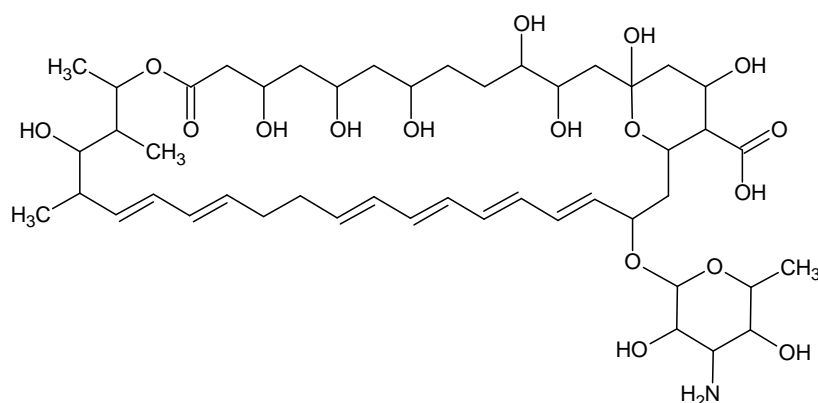
Mechanismus účinku

Prvním krokem je vazba AmB na ergosterol, který je základní stavební složkou cytoplazmatické membrány hub. Po navázání AmB vznikají ve stěně póry, a následně dochází k úniku iontů a bílkovin (enzymů) a přesunu jiných

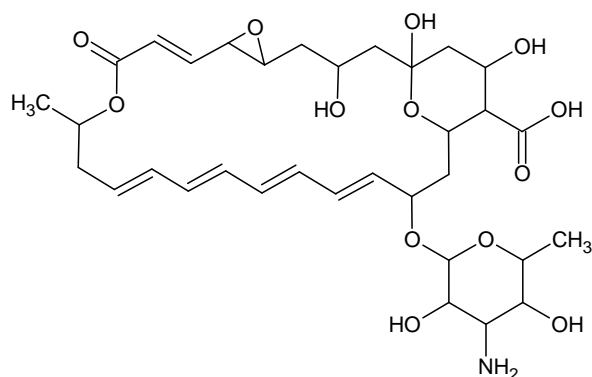
molekul do buňky až nakonec buňka hyne. Dochází také ke vstupu i velkých molekul, což je považováno za podstatu synergního účinku s některými jinými léky (např. flucytosinem). Další součástí mechanismu účinku je AmB indukovaná peroxidace membránových lipidů volnými kyslíkovými radikály, což vede k poruše permeability a poškození stěny houby (Haber 1998, Chapman et al. 2008, Rozsypal 2008).

2.4.2.2 Nystatin a natamycin (pimaricin)

Jde o preparáty určené pro lokální aplikaci při léčbě slizničních forem kandidóz a infekcí gastrointestinálního traktu. Liposomální forma nystatinu (Nyotran) je určena pro systémovou aplikaci, neboť po enkapsulaci došlo k významnému snížení toxicity; nyní je ve třetí fázi klinického zkoušení (Doležal a Buchta 2006).



Obrázek 10. Nystatin - chemická struktura

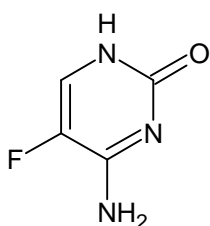


Obrázek 11. Natamycin - chemická struktura

2.4.3 Antimetabolity

2.4.3.1 Flucytosin (5-fluorcytosin, 5FC)

Tento antimetabolit má sice vysokou antifungální účinnost, ale současně také častý výskyt rezistence. Původně byl syntetizován jako perspektivní cytostatikum (v roce 1951), později však byla objevena jeho antimykotická aktivita a v roce 1972 byl uveden do klinické praxe (Haber 1998). Je hydrofilní, má výborné farmakokinetické vlastnosti, vysokou biologickou dostupnost a širokou orgánovou distribuci, ale vyžaduje složitý proces intracelulární aktivace v účinné léčivo. S tím souvisí úzké spektrum účinnosti (zahrnující především kandidy a kryptokoky, částečně i aspergily a některé původce subkutánních mykóz), které je vázané na přítomnost příslušných enzymů v buňce. Proto se málokdy používá v monoterapii, spíše v kombinaci např. s AmB (Patterson 2005). Další nevýhodou je myelotoxicita a krátký biologický poločas, který vyžaduje časté denní dávkování (Haber 1998).



Obrázek 12. Flucytosin – chemická struktura

Mechanismus účinku

5-FC se do buněk citlivých hub dostává aktivním procesem prostřednictvím membránové cytosin–permeázy. Poté se jeden z jeho intracelulárních metabolitů (5-fluorouridin trifosfát) zabuduje jako falešný prekurzor do RNA houby na místo cytosinu. Výsledkem je blokáda proteosyntézy. Další intermediární produkt metabolismu (fluoxuridin) inhibuje enzym thymidylát syntetázu, čímž zabraňuje syntéze DNA (Ghannoum a Rice 1999).

2.4.4 Azolové deriváty

Azoly zaujímají největší skupinu antifungálních látek v klinické praxi. Chemicky jde o jednu skupinu léků se stejným mechanismem účinku, inhibicí biosyntézy ergosterolu. Z praktického hlediska je lze dělit podle chemické

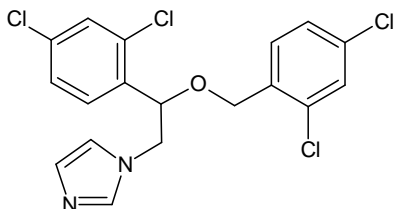
struktury na deriváty imidazolu, jejichž molekula obsahuje dva dusíkaté atomy a deriváty triazolu se třemi atomy dusíku v azolovém pětiuhlíkatém prstenci.

Mechanismus účinku

Fungistatický účinek celé skupiny má společný mechanismus, který spočívá v blokádě enzymatických systémů závislých na cytochromu P450 (inhibice 14- α -demetylázy). Tím dochází k inhibici syntézy ergosterolu, čímž je poškozena funkčnost plazmatické membrány, což se projeví zpomalením až zástavou růstu buňky a může vést až k její smrti (Chapman et al. 2008, Rozsypal 2008). Cytochrom P450 je významnou součástí enzymatického vybavení také savčích buněk, avšak vzhledem k vysoké antifungální specifitě těchto azolových preparátů, je jejich vliv z hlediska možných nežádoucích účinků klinicky bezvýznamný (Haber 1998).

2.4.4.1 Imidazolové preparáty

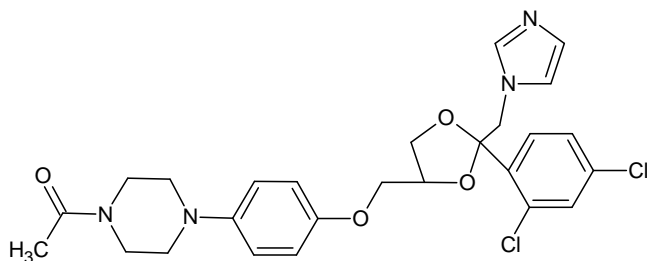
Mezi nejvýznamější imidazoly první generace patří klotrimazol, ekonazol a mikonazol. Všechny jsou topické preparáty využívané v terapii dermatomýkóz. Mikonazol byl dostupný i jako intravenózní preparát použitelný pro terapii systémových mykóz (Fromtling 1988), dnes je ale tato léková forma zastaralá a již se nevyrábí.



Obrázek 13. Mikonazol – chemická struktura

Příkladem imidazolů druhé generace jsou oxikonazol, bifonazol, izokonazol a nejvýznamnější z nich ketokonazol (Nizoral). První tři mají stejné užití jako imidazoly první generace. Vývoj ketokonazolu představoval velký pokrok v antimykotické terapii, jelikož tento preparát byl prvním širokospektrým antifungálním preparátem vhodným pro perorální aplikaci. V dnešní době je ale spíše lékem druhé volby, neboť je překonán modernějšími a bezpečnějšími triazolovými antimykotiky. Přesto má však své místo v dermatologii a

gynekologii a v terapii a profylaxi lehčích forem kandidóz (Doležal a Buchta 2006).

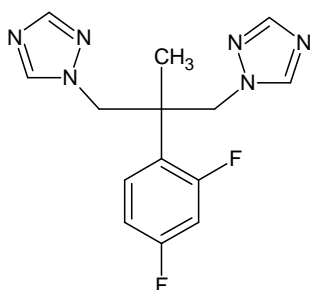


Obrázek 14. Ketokonazol – chemická struktura

2.4.4.2 Triazolové preparáty

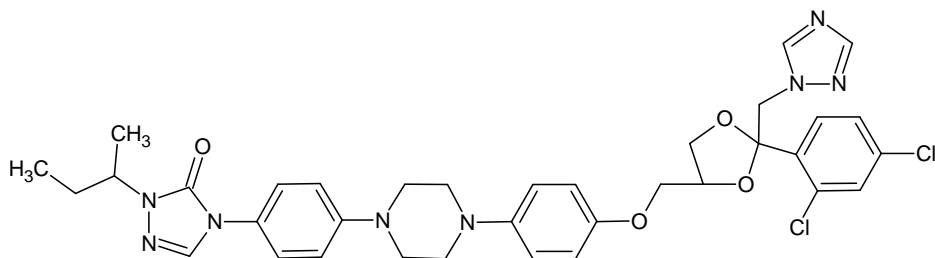
Opravdovým zlomem v antifungální terapii bylo uvedení triazolových preparátů na trh. Tyto látky řadíme do třetí generace azolových preparátů a oproti imidazolům se vyznačují vyšší specifičností vazby na cílovou strukturu, účinností vůči širšímu spektru hub a menším počtem nežádoucích interakcí a vedlejších účinků (Bailey et al 1990).

Flukonazol (Diflucan, Mycomax) je hydrofilní fluorovaný derivát se systémovým účinkem, výborným farmakokinetickým profilem (průnik do CNS), minimem lékových interakcí a vedlejších účinků a dostupností jak v perorální tak intravenózní formě. Jeho využití spočívá především v léčbě nekomplikovaných kvasinkových infekcí. Velmi dobrých výsledků dosahuje v terapii slizničních infekcí jako je orofaryngeální a vulvovaginální kandidóza. Díky tomu se stal flukonazol široce používaným lékem (včetně profylaktického podávání), což sebou nese i zvýšené riziko vývoje rezistence zejména při dlouhodobém nebo opakovaném podání (Buchta 2002).



Obrázek 15. Flukonazol – chemická struktura

Itrakonazol (Sporanox) je lipofilní chlorovaný derivát s velmi širokým spektrem účinku, které ve srovnání s flukonazolem zahrnuje většinu kvasinek a některé vláknité houby, včetně aspergilů. V dnešní době je dostupný nejen v perorální ale také již v intravenózní formě (v cyklodextrinu). Používá se především k terapii endemických mykóz, dermatomykóz, včetně onychomykóz, slizničních infekcí a některých infekcí vyvolaných kandidami rezistentními k flukonazolu.

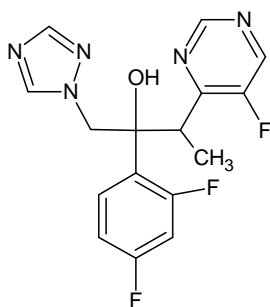


Obrázek 16. Itrakonazol – chemická stuktura

Terkonazol má podobné vlastnosti a použití jako imidazoly druhé generace, lokální aplikace u dermatomykóz (Fromtling 1988) a léčba vulvovaginální kandidózy (Buchta et al. 2008).

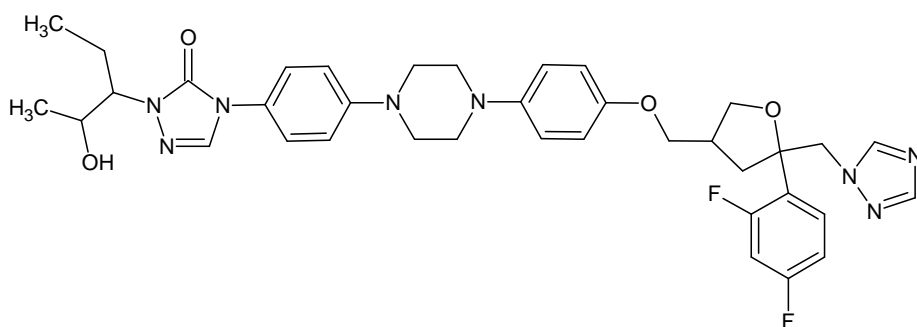
Postupem doby jsou vyvíjena další nová antimykotika se snahou výrobců o to, aby se stala ideálními pro léčbu mykotických infekcí z hlediska účinnosti, farmakokinetických vlastností či nežádoucích účinků atd. Mezi nejnovější triazolové preparáty s širokým spektrem účinku patří vorikonazol, posakonazol a ve stádiu klinických zkoušek ravukonazol a izavukonazol (Guinea et al. 2008).

Vorikonazol (Vfend) je fluorovaný derivát flukonazolu s širokým spektrem účinku, včetně flukonazol rezistentních kandid, aspergilů a některých vláknitých hub, s dobrými farmakodynamickými i farmakokinetickými vlastnostmi a minimem nežádoucích účinků. Je dostupný v intravenózní a perorální (tablety, perorální suspenze) formě a jeho využití spočívá v terapii invazivní aspergilózy a obtížně léčitelných infekcí vláknitými mikromycetami rodu *Fusarium* nebo *Scedosporium*, dále kandidémií a jiných infekcí vyvolaných kvasinkami rodu *Candida* (včetně *C. krusei* a *C. glabrata*) (Espinell-Ingroff et al. 2001). Vorikonazol je v terapii kandidových infekcí několikanásobně účinnější než flukonazol a itrakonazol a to včetně *C. glabrata* a *C. krusei* (Haber 2005).



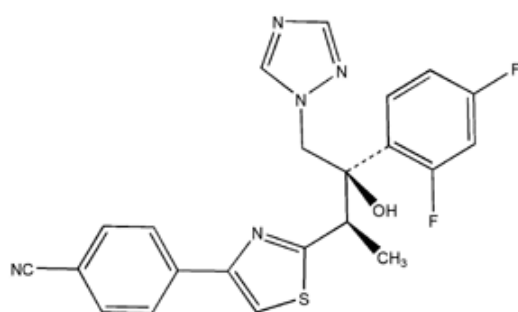
Obrázek 17. Vorikonazol – chemická struktura

Posakonazol (Noxafil) je hydroxylovaný analog itraconazolu se spektrem účinnosti stejně širokým jako u amfotericinu B a širším než u ostatních azolových preparátů, zejména proti aspergilům a některým rodům zygomycet (Sun et al. 2002, Brown 2005). Proti kandidám je posakonazol stejně účinný jako itraconazol a 8x více než flukonazol (Haber 2005). Přípravek je k dispozici ve formě suspenze k perorálnímu užití.



Obrázek 18. Posakonazol – chemická struktura

Ravukonazol je širokospektrý derivát flukonazolu s velmi dobrým efektem na kvasinky, včetně flukonazol-rezistentních kmenů (ačkoliv některé z nich (*C. tropicalis*, *C. glabrata*) jsou méně citlivé (Cuenca-Estrella et al. 2004)), dále na kryptokoky a řadu vláknitých hub včetně aspergilů. V současné době je ve fázi klinického zkoušení (Kirkpatrick et al. 2002).



ravuconazole

Obrázek 19. Ravukonazol – chemická struktura

2.4.5 Echinokandiny

Echinokandiny jsou semisyntetické analogy odvozené od fermentačních produktů některých vláknitých mikromycet (Denning 2003). Strukturálně se jedná o látky obsahující cyklické hexapeptidové jádro s postranním lipidovým řetězcem zodpovědným za antifungální aktivitu (Denning 2003, Zaas a Alexander 2005). Echinokandiny mají široké spektrum účinku zahrnující kandidy (včetně druhů rezistentních na triazoly), aspergily, cystickou formu *Pneumocystis jiroveci*. Účinek je u kandid fungicidní, u plísní fungistatický. Nejsou však účinné proti *Cryptococcus neoformans* (Feldmesser et al. 2000) a zygomycetám (Pfaller 2004). Hlavními zástupci této skupiny jsou kaspofungin, anidulafungin a mikafungin.

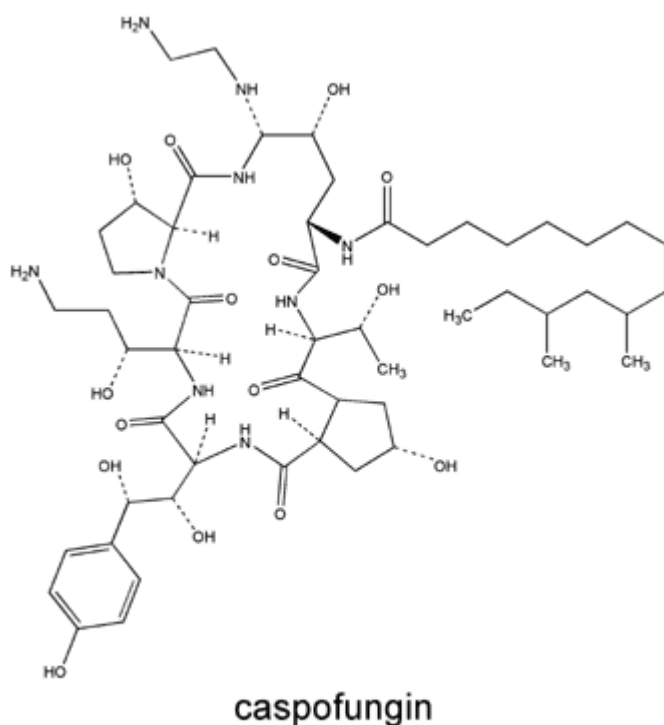
Mechanismus účinku

Echinokandiny řadíme do skupiny inhibitorů buněčné stěny hub. Jedná se o specifické nekompetitivní inhibitory β -(1,3)-glukan syntázy. Výsledkem je deplece β -(1,3)-glukanů a osmotická destabilizace buněčné stěny houby. Biotransformace nezasahuje do enzymatického systému cytochromu P450, což jednak umožňuje jejich použití v kombinaci prakticky se všemi ostatními antimykotiky a jednak s tím souvisí i minimum lékových interakcí (Haber 2005).

Kaspofungin (Cancidas)

Kaspofungin je echinokandin syntetizovaný z produktu fermentace *Glarea lozoyensis* a je prvním antimykotikem z této skupiny uvedeným do

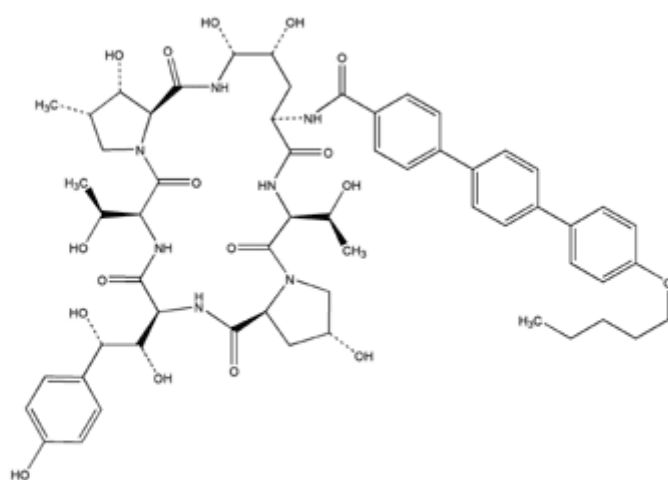
klinické praxe. K terapii se používá ve formě diacetátu (Souhrn údajů o přípravku Cancidas). Vzhledem ke své velké molekule není resorbován z gastrointestinálního traktu. V současné době patří k lékům první volby v léčbě invazivní kandidózy a kandidémie.



Obrázek 20. Kasprofungin – chemická struktura

Anidulafungin (Ecalta) a mikafungin (Mycamine)

Anidulafungin je odvozený od produktu fermentace *Aspergillus nidulans* a mikafungin od *Coleoptioma empedri*. Studie s těmito novými echinokandiny ukazují jejich potenciál pro léčbu systémové kandidózy. Mikafungin vykazoval ve dvojité slepé randomizované studii s 392 pacienty s kandidémií srovnatelnou účinnost jako lipozomální amfotericin B (Kuse et al. 2007) a anidulafungin byl ve studii se 145 pacienty s kandidémií shledán minimálně stejně účinný jako flukonazol (Reboli et al. 2007).



anidulafungin

Obrázek 21. Anidulafungin – chemická struktura

2.4.6 Nově vyvíjená antimykotika

V současné době zažívá vývoj a výzkum potenciálních antimykotik velký rozvoj. Prioritou je vývoj antimykotik s širokým spektrem účinku zahrnujícím především oportunní původce mykóz (jako jsou kandidy, aspergily, mukory atd.), ale i houbové patogeny, které jsou ke stávajícím antimykotikům často rezistentní (Buchta 2002).

Z celé řady testovaných látek se nyní pozornost upíná např. na skupinu sordarinů a nikkomycinů.

Sordariny inhibují proteosyntézu blokadí funkce fugálního translačního elongačního faktoru 2 (Dominguez a Martin 1998). Izolují se z kultury *Graphium putredini*, jsou účinné proti *Candida* sp., *Pneumocystis jiroveci*, *Cryptococcus neoformans*, dimorfním houbám, *Pseudallescheria boydii*.

Nikkomyciny jsou nukleosid-peptidová antibiotika produkovaná bakteriemi rodu *Streptomyces*. Hlavním zástupcem je nikkomycin Z. Mechanismus účinku spočívá v kompetitivní inhibici izoenzymů chitinsyntázy (Decker et al. 1990).

Antifungálně aktivní jsou i některé peptidy produkované rostlinami a živočichy (propolis). Jejich struktury i spektrum antifungální aktivity jsou

poměrně rozmanité. Od složitějších savčích peptidů byly odvozeny jednodušší polosyntetické a později plně syntetické antifungálně velmi účinné peptidy (některé z nich vstoupili do klinických zkoušek) (Doležal a Buchta 2006).

2.5 Laboratorní diagnostika patogenních hub

Metody laboratorní diagnostiky houbových patogenů vychází z morfofyziologické charakteristiky houby, kterou chceme identifikovat. Zatímco u vláknitých mikromycet téměř výhradně spoléháme na klasické testy založené na hodnocení makro- a mikromorfologických znaků, u kvasinek lze kromě morfologie jejich růstu využít i jejich biochemické aktivity.

Stanovení diagnózy houbové infekce se opírá o metody mikroskopické, kultivační, histologické, imunologické či biochemické. Ačkoliv každá z těchto metod má jinou váhu a důležitost v závislosti na etiologickém původu a lokalizaci infekce. Zatímco v diagnostice povrchových a slizničních mykóz má největší uplatnění mikroskopie a kultivační vyšetření, u systémových mykóz oportunních i endemických, nabývají na významu také metody imunologické, popř. molekulárně-biologické. Samostatnou kapitolou je histologické vyšetření, kdy nález houby v přirozeně sterilní tkáni představuje jednoznačný průkaz mykotického agens, zejména v diagnostice oportunních, endemických či slizničních mykóz.

Materiál na mykologické vyšetření při podezření na kvasinkovou infekci se odebírá podle klinické formy onemocnění (Tab. 2). K vyšetření musí být zaslán rychle nebo zchlazený, protože kvasinky jsou schopny množení i při běžné teplotě a může tak být zkresleno jejich kvantitativní hodnocení.

Tabulka 2. Biologický materiál pro mykologické vyšetření

Lokalizace	Typ odběru/ materiálu
Kožní	seškrab, stěr
Slizniční	stěry, výtěry (z dutiny ústní, vaginy,...)
Ostatní	krev, likvor, moč, BAL, sputum, aspiráty, hnis,...

2.5.1 Mikroskopie

Mikroskopické preparáty jsou většinou snadno proveditelné a mohou být prohlíženy krátkou dobu po odběru, proto mají v laboratorní diagnostice mykóz nezastupitelnou úlohu (Otčenášek et al. 1990, Larone 1995). Z přítomnosti dalších elementů (epitelie, leukocyty, ...) můžeme usuzovat na přítomnost zánětu. Význam mykotického nálezu ve vyšetřovaném vzorku je dán zejména morfologickou formou kvasinky (kvasinka – pseudo/hyfa), která poskytuje důležitou informaci v rozhodování, zda se jedná o kolonizaci nebo infekční proces. Nevýhodou tohoto vyšetření je relativně malá senzitivita a specifita, která je nižší než u kultivace. Negativita přímé mikroskopie klinického materiálu tedy nevylučuje mykotickou infekci (Alexander a Pfaller 2006).

2.5.1.1 Nativní preparát

Používá se pouze k orientačnímu zjištění velikosti a tvaru kvasinky a k případnému odlišení od bakterií.

Vyšetřovaná kolonie kvasinky se resuspenduje v kapce fyziologického nebo (pro lepší zviditelnění) Lugolova roztoku či roztoku bavlnové modři a prohlíží se mikroskopem v suchém systému při dvěstěásobném zvětšení.

2.5.1.2 Louhový preparát

Slouží k projasnění a rozlišení houbových struktur především v kožních šupinách, nehtech a dalších kožních adnexech, bioptickém a nekroptickém materiálu. U kvasinkových onemocnění má největší uplatnění v gynekologii při vyšetření vaginálního sekretu pro diferenční diagnostiku poševního zánětu mikrobiálního původu.

Vyšetřovaný materiál se umístí do kapky roztoku hydroxidu draselného (nebo sodného) o koncentraci 10 – 20%, ke kterému lze pro zvýraznění houbových buněk přidat Parkerův inkoust (Mycoink) v poměru 10 : 1. Po asi dvacetiminutovém působení louhu se lehkým tlakem na krycí sklíčko preparát roztlačí a prohlíží mikroskopem v suchém systému při dvěstěásobném zvětšení (Larone 1995).

2.5.1.3 Preparáty obarvené dle Grama

Používají se převážně pro diagnostiku přítomnosti kvasinek ve stěrech ze sliznice a v nátěru z tekutých materiálů. V takto obarvených preparátech se kvasinky jeví jako G+ oválné buňky velikosti 3 – 5 μm . Při invazivní formě onemocnění je v preparátu možno pozorovat i přítomnost vláknitých struktur kvasinek (pseudomycelium, mycelium). Kromě mykotického nálezu lze hodnotit také přítomnost bakteriální flóry, epitelii, leukocytů atd.

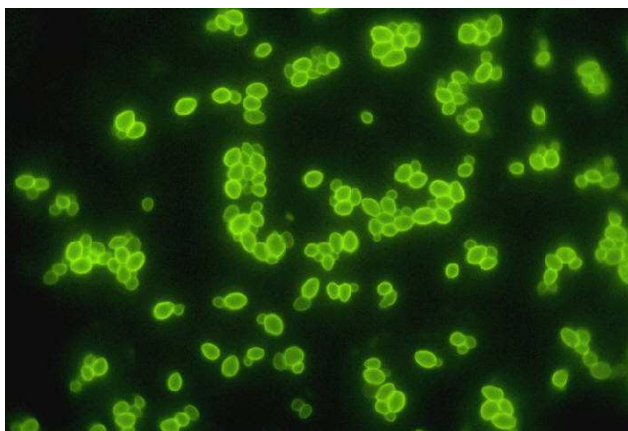


Obrázek 22. Kvasinky obarvené dle Grama (1000x)

http://www.skinandaging.com/files/imagecache/normal/photos/sa05_si_candida02.tif.jpg

2.5.1.4 Fluorescenční mikroskopie

Pomocí fluorescenční barvy (Calcofluor, Rylux), která se specificky váže na chitin ve stěně hub, lze obarvit nejen kvasinky ale i ostatní houby a sledovat je v dopadajícím světle fluorescenčního mikroskopu (Marines et al. 1987, Borg-von Zepelin a Wagner 1995).



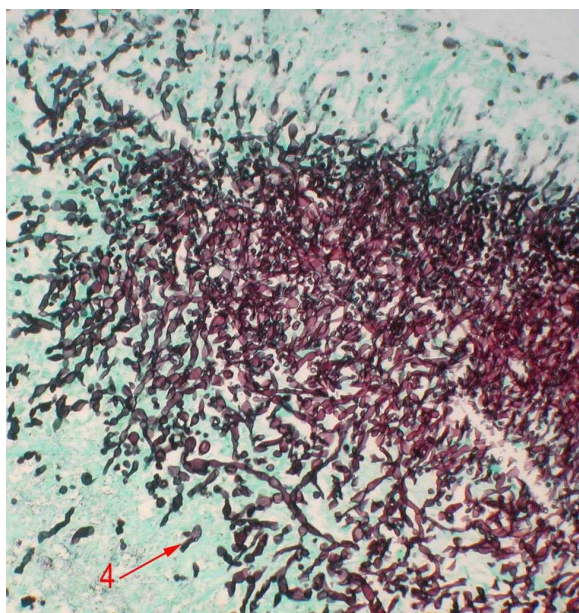
Obrázek 23. Fluorescenční barvení – pučící buňky *C. albicans* (1000x)

<http://overcomingcandida.com/mycology/candid.jpg>

2.5.2 Histologické vyšetření

Histologický průkaz mykotických patogenů v primárně sterilní tkáni představuje jednoznačný průkaz houby, zejména v diagnostice invazivních mykóz. Jeho velkou výhodou je vedle vysoké specifity především rychlost dostupnosti výsledků vyšetření (Ráčil et al. 2007). Histologické vyšetření kousku tkáně je nejspolehlivější metoda stanovení diagnózy systémové houbové infekce. Nicméně, to jak snadno je houbový patogen v tkáni rozpoznán, závisí na jeho množství a přítomnosti charakteristických morfologických znaků (Ellepola a Morrison 2005).

Histologické preparáty z tkání se zhotovují technikou ultratenkých řezů na mikrotomu. Standardní histologické barvení hematoxylin – eozinem dokáže zobrazit nejen mykotické agens, ale i tkáňovou reakci v jeho okolí. Pro zvýšení citlivosti záchytu se používají speciální metody – barvení Schiffovou metodou (PAS = periodic acid Schiff) a metoda stříbření dle Grocotta a Gomoriho (Ráčil et al. 2007). PAS barví kandidy intenzivně ohnivě červeně až purpurově, zvláště jejich stěny. Při barvení dle Grocotta jsou stěny houbových buněk různě tmavě hnědé, tmavě šedé, kovově modročerné a při intenzivnějším stříbření jsou celé buňky úplně černé. Pro zvýšení pravděpodobnosti záchytu infekčního agens ve tkáni lze využít imunofluorescenčních metod. Jsou popsány metody využívající mono- nebo polyklonální protilátky zaměřené proti buněčným strukturám hub.



Obrázek 24. Stříbření dle Grocotta (šipka ukazuje pučící buňku) (1000x)

http://www.missionforvisionusa.org/anatomy/uploaded_images/CandidaGMS-780502.jpg

2.5.3 Kultivace

2.5.3.1 Kultivační média

Kandidy jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy poměrně málo růstově náročné. Nejužívanějším kultivačním médiem je Sabouraudův glukózový agar (SGA). K potlačení doprovodné bakteriální flóry bývá doplněn o chloramfenikol (50 mg/L), případně jiná antibiotika (gentamicin). Mezi další používaná media patří např. sladinkový agar. Kvasinky ale rostou i na krevním nebo čokoládovém agaru.

V posledních letech se na trhu objevilo několik druhů diferenciálně diagnostických chromogenních půd (CHROMagar Candida, HiCrome Candida Agar, CandiSelect atd.), využívaných k izolaci ale především na identifikaci některých druhů kandid (viz níže) (Vejsová a Buchta 2006).

Doba kultivace se pohybuje od 24 do 72 h (nejčastěji 48 h) při teplotě $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Při kultivaci materiálu z kůže a kožních adnex se nejčastěji používá inkubace v termostatu při 26°C po dobu 4 – 7 dnů (Larone 1995).

Interpretace nálezu

Kultivace kvasinek z biologických materiálů je základem laboratorní diagnostiky (Otčenášek et al. 1990, Larone 1995). Nespornou výhodou je možnost pracovat s čistou kulturou a moci určit vykultivovanou kvasinku do rodu a druhu, případně otestovat její citlivost na antimykotika. Prediktivní hodnota pozitivního kultivačního nálezu závisí na původu klinického materiálu. Kandidy jsou převážně oportunní patogeny, které jsou přirozenou součástí lidských integumentů, zejména sliznic, proto lze za signifikantní nález označit pozitivní kultivaci z primárně sterilních materiálů (krev, mozkomíšní mok, biopsie tkáně). Zcela odlišná je prediktivní hodnota průkazu mykotického agens z přirozeně nesterilních materiálů jako je BAL, sputum, moč, různé punkáty atd. Při interpretaci těchto nálezů je nutné myslet na možnost kolonizace či kontaminace saprofytickými kmeny kandid, dále na kvantitu, frekvenci pozitivního nálezu a především na vícečetné kolonizace. Pittet se spolupracovníky ve své práci definovali *Candida* kolonizační index, který napomáhá v diskriminaci mezi kolonizací a aktivní kandidovou infekcí. Jedná se o poměr počtu kultivačně pozitivních materiálů (kolonizace stejným

kvasinkovým kmenem; vyjma hemokultivace) a všech provedených odběrů. Je-li tento poměr roven a vyšší než 0,5, je pacient ve zvýšeném riziku kandidové infekce (Pittet et al. 1994). Zároveň je třeba brát v úvahu klinický stav pacienta (komunikace mezi klinikem a laboratoří), popř. vyšetření opakovat, doplnit nebo ověřit dalšími testy.

2.5.4 Druhov^á identifikace

Významným trendem od 80. let je vzrůstající podíl non-*albicans* druhů kandid (Odds 1996, Krčméry a Kovačičová 2000, Chang et al. 2008). Různé druhy mají rozdílnou citlivost k antimykotickým preparátům, proto má rychlá a přesná identifikace klinický význam. Kromě toho identifikace druhu kvasinky dává možnost sledovat epidemiologii kolonizace a infekce, případně přenos infekce v nemocnicích. Navíc riziko rozvoje hluboké orgánové kandidózy a závažnost klinické manifestace se liší v závislosti na infekčním agens. Například *Candida tropicalis* častěji přechází do své invazivní formy u pacientů s neutropenií než u pacientů s transplantovanými játry (Rabkin et al. 2000, Denning et al. 2003).

2.5.4.1 Testy založené na biochemické aktivitě kvasinek

Biochemické vlastnosti kandid se hodnotí na základě několika druhů testů. Asimilační testy, které se nazývají auxanogramy, se používají pro zjišťování schopnosti asimilace cukrů a dusíkatých látek. Na podobném principu jsou založeny zymogramy, kde se sleduje schopnost zkvašování cukrů.

2.5.4.1.1 Auxanogram

Cukerný auxanogram se připravuje z izolovaných kolonií kvasinek narostlých na SGA. Hodnotí se utilizace testovaných cukrů, která je pro jednotlivé druhy kvasinek charakteristická. Pomocí této „home-made“ metody je možno poměrně spolehlivě a levně určit většinu běžně se vyskytujících patogenních druhů kvasinek.



Obrázek 25. Axanogram – *C. lusitaniae* po 24 h inkubaci při 27°C Foto: B. Voxová

2.5.4.1.2 Zymogram

Tento test může být prováděn buď ve zkumavkách nebo v mikrotitrační destičce (komerčně dodávané stripy – např. ITEST ZYMOGRAM), které obsahují dehydratované cukerné substráty, živné médium a acidobazický indikátor. Po inokulaci testů je nutno zakápnout každou jamku/zkumavku parafínovým olejem, aby bylo vytvořeno anaerobní prostředí. Při fermentaci substrátů dochází k výraznému okyselení média. Po inkubaci se sleduje barevná změna acidobazického indikátoru přítomného v živném médiu a tvorba plynu pod vrstvou parafínového oleje nebo Durhamovy zkumavky („plynovky“). Zastoupení fermentovaných cukrů je pro jednotlivé druhy kvasinek charakteristické.

2.5.4.1.3 Komerční testy

Ačkoliv jsou tyto konvenční identifikační metody poměrně levné, jsou pracné a časově náročné. V dnešní době je nahrazují rychlé komerčně dostupné identifikační soupravy, vyvinuté pro určení druhu zejména non-*albicans* kandid, ale také jiných rodů (*Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum* atd.) Mezi nejčastěji používané komerční identifikační systémy patří ID32 C (BioMérieux, Francie), Api 20 C AUX (BioMérieux, Francie), Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur), VITEK 2 Yeast Card (BioMérieux, Francie), RapID Yeast Plus (Innovative Diagnostic Systems,

USA), Api Candida (BioMerieux, Francie), Fungichrom I system (International Microbio, Francie), Fugifast I *twin* system (International Microbio, Francie), CANDIDAtest 21 (PLIVA Lachema Diagnostika, Česká republika) a další.

ID 32 C

Tento identifikační systém využívá standardizované a miniaturizované asimilační testy a speciálně sestavenou databázi kvasinek, které lze tímto systémem identifikovat. Strip se skládá z 32 jamek obsahujících dehydratované substráty (cukry, organické kyseliny, aminokyseliny), test na stanovení citlivosti k cykloheximidu a jeden kolorimetrický test (eskulin). Dále souprava obsahuje ampuli s 2 ml sterilní destilované vody, do které se připraví inokulum vyšetřované kvasinky (narostlé na SGA) o hustotě 2. stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Z takto připravené suspenze se přenese 250 µl do ampule označené jako C Medium, která obsahuje 7 ml polotuhého, chemicky definovaného média. Po důkladné homogenizaci se napipetuje do každé jamky stripu 135 µl C Media (s inokulem), přikryje se víčkem a inkubuje se 48 h při $29 \pm 2^\circ\text{C}$. Nárůst kvasinky v jednotlivých jamkách lze hodnotit buď vizuálně nebo pomocí automatického čtecího zařízení. Identifikační software určí druh kvasinky resp. míru pravděpodobnosti shody jejího profilu s referenčním kmenem pro daný druh; případně navrhně, které testy lze ještě dodělat, aby byla identifikace přesnější.



Obrázek 26. ID 32 C – v horní polovině *C. krusei*, v dolní polovině *C. parapsilosis* po 48 h inkubaci při 30°C Foto: V. Buchta

Auxacolor

Tento 16-tijamkový identifikační systém je založený na principu utilizace 13ti cukerných substrátů. Každá jamka kromě dehydratovaného cukru obsahuje základní roztok a pH indikátor (bromkresolová červeň). Růst kvasinek je indikován barevnou změnou indikátoru z modré na žlutou. Dále strip obsahuje test na rezistenci k aktidionu (cykloheximid) s oxido-redukčním indikátorem, který při rezistenci k aktidionu (růst kvasinky) mění zbarvení z modré na růžovou nebo bezbarvou. Kromě toho strip umožňuje detekci fenoloxidázové aktivity *Cryptococcus neoformans*, pozitivní výsledek je indikován zelenou či hnědou barvou. Provedení testu je jednoduché. Kvasinkou narostlou na SGA se inokuluje přiložené suspenzní médium tak, aby se získal zákal ekvivalentní zákalu kontroly obsažené v testu. Samotný strip se pak inokuluje 100 µl připravené suspenze do každé jamky, inkubuje se 24 až 48 h při $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Po inkubaci se odečte barevná reakce v jamce a určí se pozitivní a negativní reakce. Podle přiloženého schématu se pozitivním jamkám přidělí číselné skóre, tj. 5ti-místný číselný kód odpovídající profilu dané kvasinky z přiložené tabulky.



Obrázek 27. Auxacolor

<http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/ug/ugteach/dental/tutorials/images/fungi/auxacolor.jpg>

2.5.4.1.4 Chromogenní média

Kultivaci kvasinek na chromogenních půdách lze zařadit mezi rychlé testy, pomocí nichž lze rychle a spolehlivě identifikovat hlavní kvasinkové patogeny – především *C. albicans*, která je nejčastěji izolovanou kvasinkou z klinických materiálů s podílem 60 až 80% všech izolátů.

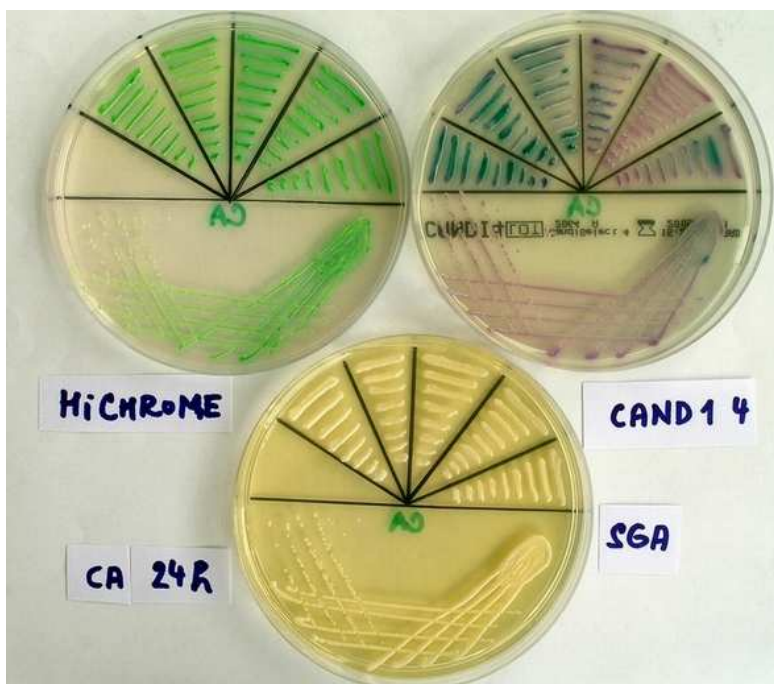
Tato média obsahují chromogenní a fluorogenní substráty, čímž usnadňují druhovou identifikaci kandid na základě pigmentace kolonií, která je způsobená reakcí druhově specifických enzymů se substrátem půdy. Zároveň tato média obsahují antibiotikum k inhibici růst bakterií.

CandiSelect (BioRad, Francie) je dodáván ve formě hotových agarových ploten. Médium obsahuje růstový základ (pepton, kvasničný extrakt, glukóza), chromogenní substrát, dvě antibiotika k potlačení růstu bakteriální flóry (chloramfenikol, gentamicin) a skladuje se při 4°C. Inokulovaná plotna se inkubuje 24–48 h při 35–37°C. *Candida albicans* roste jako modře zbarvené kolonie, ostatní kvasinky vytváří kolonie v různých odstínech bílé.

HiCrome Candida Agar (HiMedia) se připravuje podle instrukcí výrobce z polotovaru ve formě prášku. Médium obsahuje pepticky natrávené zvířecí tkáň, kvasničný extrakt, sladový extrakt, glukózu, chromogenní substrát a chloramfenikol. Inokulovaná plotna se inkubuje 24–48 h při 30°C. *C. albicans* narůstá na tomto médiu v zelených koloniích s leskem, *C. tropicalis* v matných modrých koloniích, *C. glabrata* v ve světle růžových koloniích, ostatní kvasinky v různých odstínech růžové, béžové a bílé.

CHROMagar Candida (Becton Dickinson, USA) obsahuje pepton, glukózu, agar, chloramfenikol a směs chromogenních substrátů. Inokulované plotny se inkubují 24–48 h při 36°C. *C. albicans* vytváří zelené kolonie, *C. tropicalis* modré, *C. krusei* světle fialové matné ploché, *C. glabrata* fialové lesklé. Ostatní kvasinky narůstají v různých odstínech béžové až fialové barvy, případně bílé.

Další chromogenní média: Albicans ID2 agar (BioMerieux, Francie), BIGGY agar (Oxoid, Velká Británie) atd.

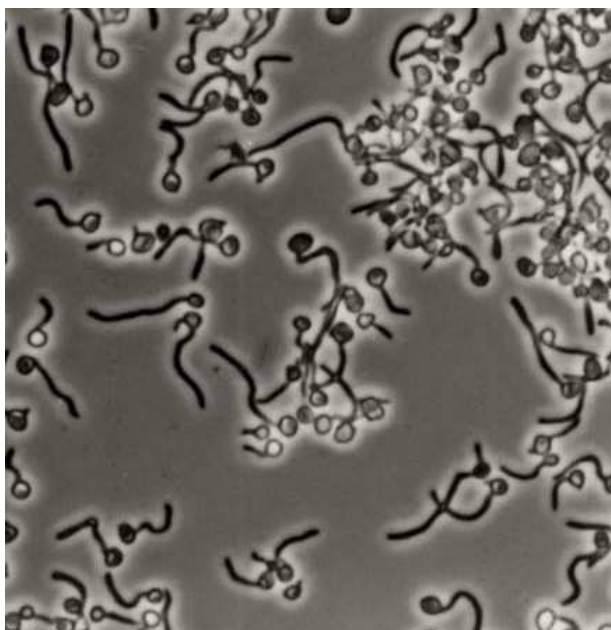


Obrázek 28. Chromogenní agary (*C. albicans* po 24 h kultivaci na HiCrome Candida agaru a CandiSelect 4 agaru ve srovnání s kultivací na Sabouraudově glukózovém agaru (dole)) Foto: V. Buchta

2.5.4.2 Testy založené na hodnocení morfologie kvasinek

2.5.4.2.1 Test klíčních hyf (germ–tube test)

Jde o jednoduchou, rychlou, levnou a vysoce specifickou metodu sloužící k průkazu tvorby klíčních hyf (germ tubes), kterou je možno za daných podmínek pozorovat pouze u *C. albicans*. Test je založen na principu tříhodinové inkubace vyšetřovaného kmene kvasinky homogenizované v bovinním (nebo eventuálně i lidském) séru při 37°C. Pro tento test lze použít i přesně definované syntetické médium NYP (Marichal et al.1986). Po inkubaci se přenese část homogenátu na podložní sklíčko a přítomnost klíčních hyf se detekuje mikroskopicky při dvěstěnásobném zvětšení. Z praktického hlediska hodnocení germinačního testu je největší komplikací tvorba pseudohyf, která se vyskytuje u velké části non-*albicans* druhů. Od klíčních hyf se liší zaškrcením v místě, kde vyrůstají z mateřské buňky a širší bází vyrůstající pseudohyfy. Dále je třeba dbát na velikost inokula, neboť příliš velké inokulum ($>10^6$ CFU/ml) může díky produkci quorum sensing (farnesol) potlačovat tvorbu klíčních hyf a vést k falešné negativitě výsledku (Vejsová a Buchta 2006).



Obrázek 29. Klíční hyfy *C. albicans* (400x)

http://www.pfdb.net/photo/iwaguchi_s/box1/standard/germ_tube-1.jpg

2.5.4.2.2 Hodnocení morfologie kvasinek na nutričně chudých médiích

Schopnost tvorby pseudo/mycelia a jeho uspořádání je jedním z diferenciálně diagnostických znaků používaných pro druhovou identifikaci kvasinek. K stimulaci tvorby pseudomycelia se používá nejčastěji kukuřičný nebo rýžový agar s přidavkem Tweenu 80. Testovaná kultura se rozizoluje po povrchu kultivačního média v Petriho misce a inkubuje se v termostatu při 27°C po dobu 24 – 72 hod. Přítomnost a charakter tvorby pseudomycelia se zjišťuje přímou mikroskopií kultury (in situ).

Pro identifikaci *C. albicans* se v případě tohoto testu využívá charakteristické vlastnosti této kvasinky, kterou je tvorba pseudomycelia a silnostěnných chlamydospor. Ne všechny kmeny *C. albicans* jsou ale schopny tvořit chlamydospory, zhruba 1/3 zástupců tohoto druhu je nevytváří.

2.5.4.2.3 Hodnocení makromorfologie nejčastěji se vyskytujících kvasinek

Candida albicans (SGA, 35°C, 7 dní)

C. albicans tvoří dva typy kolonií. Z klinického materiálu rostou většinou kolonie 2 – 4 mm, porcelánově bílé až lehce krémové, mírně až polokulovitě vyklenuté, hladké a lesklé, mazlavé konzistence. Někdy se na povrchu vytváří mírné vrásnění. Okraj je kruhovitý, nevláknitý, někdy vmáčklý do agaru. Spodní

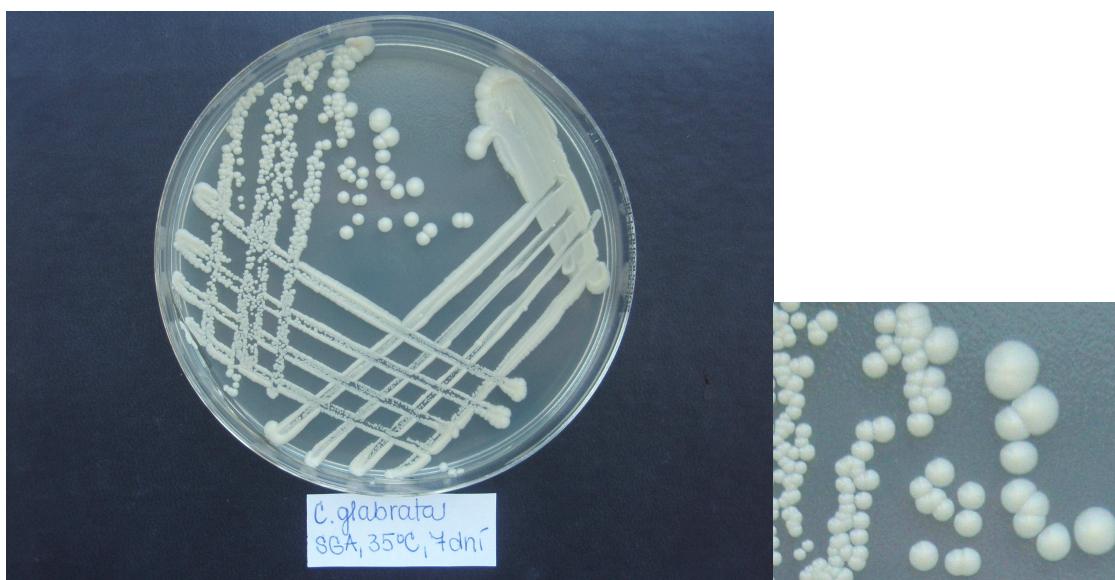
strana je bělavá nebo neurčitě krémová, půda nezměněna. Matný fenotyp se liší šedou barvou kolonií a bývá izolován více z vnějšího prostředí. Kolonie jsou širší a plošší.



Obrázek 30. *C. albicans* na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail) Foto: M. Vejsová

Candida glabrata (SGA, 35°C, 7 dní)

Kolonie 2 – 4 mm, porcelánově bílé až nažloutlé, hladké, lesklé s kruhovým okrajem, mazlavá konzistence.



Obrázek 31. *C. glabrata* na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail) Foto: M. Vejsová

Candida tropicalis (SGA, 35°C, 7 dní)

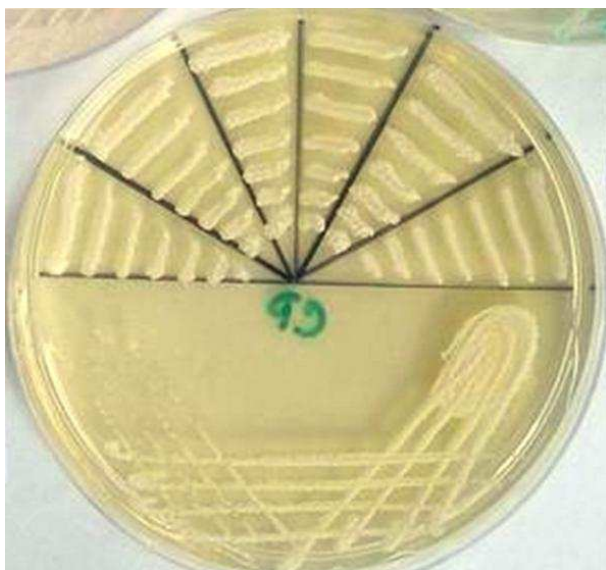
Kolonie 3 – 6 mm, porcelánově bílé až bělavě či šedavě krémové, hladké, lesklé s kruhovým okrajem a mazlavou konzistencí nebo matné, téměř polokulovitě vyklenuté, zvrásněné s krátce až mohutně vláknitým okrajem.



Obrázek 32. *C. tropicalis* na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail) Foto: M. Vejsová

Candida parapsilosis (SGA, 35°C, 7 dní)

Kolonie 3 – 5 mm, bílé nebo krémové barvy, povrch lesklý, hladký, střed vyvýšený nebo kráterovitě propadlý. Okraj kruhovitý nebo slabě laločnatý, nevláknitý nebo později jemně a krátce vláknitý. Některé kmeny vytváří charakteristické kolonie, jejichž povrch je suchý, drolivý, tvořený ornamenty připomínajícími různě postáčená vlákna, květy nebo květák.



Obrázek 33. *C. parapsilosis* na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail) Foto: V. Buchta

Candida krusei (SGA, 35°C, 7 dní)

Kolonie 3 – 8 mm, bílé, šedé až krémově zbarvené, nejčastěji matné, ploché, někdy s mírně vyvýšeným středem. Okraj buď okrouhlý, mírně zoubkovaný nebo laločnatý a mohutně vláknitý.



Obrázek 34. *C. krusei* na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail) Foto: M. Vejsová

2.5.5 IMUNOLOGICKÝ PRŮKAZ

2.5.5.1 Sérologie

Protilátky proti kandidám jsou často přítomny i u zdravých osob, protože každý jedinec se během svého života setká s kvasinkami. Protilátky jsou pak v nízkých titrech tvořeny i v případě, že se přítomnost kvasinky lze označit za saprofytickou. Kromě této falešné positivity, kdy dochází k imunitní odpovědi na antigeny kvasinek kolonizujících sliznice, se můžeme setkat i s falešnou negativitou u imunokompromitovaných pacientů. Dojde-li však k rychlému vzestupu titru protilátek, svědčí to o přítomnosti kandidové infekce. Zpočátku se tvoří více protilátek typu IgM, později (za několik dní) stoupá titr protilátek typu IgG a zároveň úměrně klesají protilátky typu IgM. V současné době se k průkazu kandidových protilátek využívají metody aglutinace, komplement fixace, imunodifúze, protisměrná imuno elektroforéza, případně ELISA.

Platelia Candida Ab/Ac/Ak

Jde o dvou krokovou imunoenzymatickou metodu, kterou lze pomocí vysoce specifického antigenu mananu stanovit titr protilátek v séru pacientů. Při použití tohoto testu je zjištěná hodnota 5-10 UA/ml interpretována jako intermediární a hodnoty >10 UA/ml jako pozitivní.

2.5.5.2 Průkaz antigenu

U pacientů se sníženou imunitou, kteří nevytvářejí protilátky, se prokazuje přítomnost houbového antigenu, a to metodami ELISA, RIA, latexovou aglutinací a komplementfixací. Tímto prokazovaným antigenem je buď manan buněčné stěny, složky cytoplazmy nebo panfungální antigen (1,3)- β -D-glukan.

Pastorex Candida (BioRad, latexová aglutinace)

Tato souprava umožňuje detekci hlavního glykoproteinu buněčné stěny kandid – mananu. Tento rozpustný antigen lze stanovit v séru pacientů se systémovou kandidózou. Princip metody spočívá ve vazbě krysí monoklonální protilátky označené barevnými latexovými partikulemi na manan. Pokud vyšetřované sérum obsahuje manan, v roztoku se vytvoří okem viditelný aglutinát. Pozitivní nález lze částečně kvantifikovat naředěním reakčních protilátek (titrováním). Detekční limit této soupravy je 2,5 ng mananu/ml. Ačkoliv

je latexová aglutinace dostatečně specifická, vzhledem k nižší senzitivitě se dnes převážně využívá ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metoda.

Platelia Candida Ag (BioRad, ELISA)

Jedná se o jednokrokovou sendvičovou imunoenzymatickou metodu umožňující detekci mananu v lidském séru pomocí monoklonálních krysích protilátek. Souprava obsahuje negativní a pozitivní kontrolu, ze které si lze postupným naředěním připravit standardy pro kalibrační křivku. Jde tedy o metodu kvantitativní a výsledek je udáván v ng/ml. Detekční limit je 0,1 ng/ml.

Fungitel (Cape Cod)

(1,3)- β -D-glukan je hlavní složkou buněčné stěny různých medicínsky významných hub a uvolňuje se při jejich růstu (proto může být markerem aktivní infekce). Fungitel je kolorimetrický test pro kvalitativní detekci (1,3)- β -D-glukanu v séru pacientů se symptomy nebo predispozicemi k invazivní houbové infekci. Ačkoliv pozitivní výsledek neurčuje, jaká taxonomická skupina hub infekci způsobuje, může stanovení koncentrace glukanu pomáhat v diagnóze hlubokých mykóz a fungémií. Princip metody je založen na schopnosti (1,3)- β -D-glukanu obsaženém ve vzorku specificky reagovat s amébocyty ostrorepa *Limulus polyphemus* a aktivovat enzymatickou kaskádu, která končí detekcí barevného substrátu. Detekční limit je 30 pg/ml. Přestože je (1,3)- β -D-glukan panfungální antigen, není pomocí Fungitel testu možno identifikovat všechny druhy hub jako např. rod *Cryptococcus*, který produkuje velice nízkou hladinu (1,3)- β -D-glukanu nebo zygomycety jako *Absidia*, *Mucor* či *Rhizopus*, u kterých není produkce (1,3)- β -D-glukanu známa.

Nové možnosti pro detekci kandidové infekce jsou např. purifikované antigeny, monoklonální protilátky, mapování epitopů, rekombinační DNA techniky a PCR technologie. Jako příklad lze uvést použití kandidové proteázy. Její využití (izolované a purifikované) spočívá jednak v jejím použití jako antigenu, ale současně také pro získávání protilátek pro její vlastní imunologický průkaz. V séru pacientů, zejména při postižení invazivní kandidózou, lze právě protilátky proti extracelulární proteáze snadno detekovat. Průkaz se zde provádí testem ELISA. Pro průkaz invazivity kandidových infekcí jsou dalšími nezávislými testy stanovení sekreční proteázové aktivity

kandidových izolátů a další sérologické metody využívající tento purifikovaný enzym.

2.5.6 Molekulárně biologické metody

Jde o skupinu nekultivačních metod, které využívají detekci nukleových kyselin mykotických agens pomocí různých modifikací polymerázové řetězové reakce (PCR). Nejslibnějším přístupem je kombinace širokospektré PCR (s použitím univerzálních panfungálních primerů), kdy je amplifikován produkt společný pro téměř všechny patogenní houby s následnou specifikací amplifikovaného produktu pomocí restriční endonukleázové analýzy, sekvenace nebo hybridizace (Flahaut 1998, Jaeger 2000, Kanbe 2002). Lze použít i druhově specifické primery, ale pouze na velmi omezené spektrum. V současné době však molekulárně biologické metody stále nepatří mezi rutinní postupy při diagnostice mykóz. Hlavní příčinou je neexistence mezilaboratorní standardizace (problém tkví především ve způsobu izolace houbové DNA).

2.6 Testování antifugální citlivosti

Důvody testování citlivosti k antimykotikům spočívají jednak v potřebě volby antimykotika na základě aktuální citlivosti, jednak ve sledování rezistentních kmenů hub. Vedle monitorování citlivosti etiologických původců k antifungálním lékům, mají výsledky testování rovněž význam pro sledování epidemiologické situace v daném zařízení.

Stanovení *in vitro* citlivosti houbových patogenů k antimykotikům je dnes součástí rutinního laboratorního testování. V současné době ale nabývá na významu vzhledem ke zvyšujícímu výskytu mykotických infekcí a to především druhy se sníženou citlivostí (nebo dokonce rezistencí) k některým antimykotikům.

V posledních letech došlo k pokroku ve standardizaci metod vhodných pro testování *in vitro* citlivosti mikromycet. K dispozici je na trhu i několik komerčních souprav pro stanovení citlivosti, které vychází z těchto standardů.

2.6.1 Agarové difúzní metody

2.6.1.1 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test je semikvantitativní metoda využívající papírové disky nasycené určitou koncentrací antimykotika, které se kladou na povrch inokulovaného agaru. Pro testování mykotických agens se používá Mueller-Hintonův agar s 2% glukózy a methylenovou modří (0,5 µg/l) (MH), pH by se mělo pohybovat mezi 7,2 – 7,4. Očkuje se inokulum o hustotě 0,5 McFarland, inkubuje se 24 h při teplotě 35°C. Podle průměru inhibiční zóny (v mm) je testovaný kmen zařazen do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD – Susceptible Dose Dependent) nebo rezistentní (R). Velikost inhibiční zóny závisí na množství a difuzibilitě antimykotika v disku, tloušťce agaru a hustotě inokula. Podle metodiky publikované Barrym a Brownem v roce 1996 schválilo v roce 2004 Clinical Laboratory Standard Institute, Pensylvania, USA (CLSI dříve NCCLS) diskovou metodu testování citlivosti kvasinek na flukonazol a následně vorikonazol jako standard M44-A. Metodika byla ověřena i v celosvětové surveillance studii ARTEMIS (Pfaller et al. 2005). Výhodou testu je jednoduchost, finanční nenáročnost a možnost testování více antimykotik zároveň na jedné plotně. Relativní nevýhodou malý počet antimykotik se stanovenými interpretačními hranicemi (break-point) (viz tab. 3)



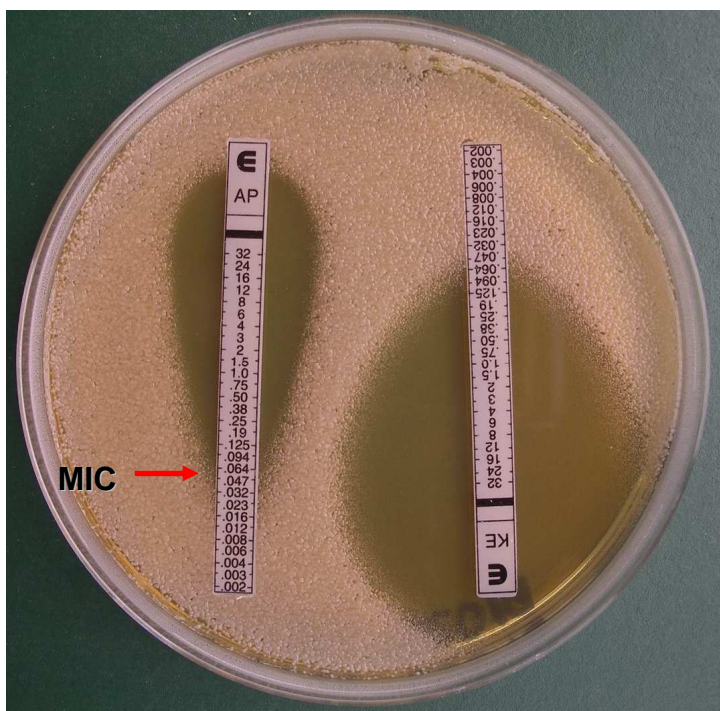
Obrázek 35. Diskový difúzní test (*C. albicans*) Foto: V. Buchta

Tabulka 3. Interpretační kritéria standardu CLSI M 44-A (velikost zón v mm).

	S	SDD	R
Flukonazol	≥19	15 – 18	≤14
Vorikonazol	≥17	14 – 16	≤13

2.6.1.2 Gradientový difúzní test

Gradientový difúzní test – E-test (AB Biodisk, Švédsko) je metoda umožňující kvantitativní stanovení citlivosti k antimykotikům, která kombinuje principy diskové difúzní a diluční metody. E-test je plastový proužek, který je napuštěn koncentrací daného antimykotika v dehydratované formě. Na povrchu je vyznačena stupnice odpovídající rozmezí cca 15 ředění antimykotika, která slouží k odečítání minimální inhibiční koncentrace (MIC). Na povrch inokulovaného agaru (MH, Casiton) se proužek přiloží stranou, která obsahuje antimykotikum. Po inkubaci (24 – 48 h při 35°C) se kolem E-testového proužku vytvoří inhibiční zóna elipsovitého tvaru a v místě, kde se dotýká okraje proužku, se na stupnici odečítá hodnota MIC. Podle této hodnoty se testovaný kmen zařadí do kategorie citlivý, citlivý v závislosti na dávce (azoly) eventuálně intermediární (amfotericin B, flucytosin) a rezistentní podle interpretačních kritérií CLSI (NCCLS 2002). E-test vykazuje vysoký stupeň shody se standardem M27-A (Matar et al. 2003, Pfaller et al. 2004, Alexander et al. 2007). V současné době jsou na trhu diagnostické proužky pro testování flukonazolu, vorikonazolu, itrakonazolu, ketokonazolu, amfotericinu B, flucytosinu nově také pro posakonazol a kaspofungin. Metodika se vyznačuje vysokým stupněm propracování, poskytuje přesný návod na přípravu média, inokula a interpretaci v závislosti na testovaném antimykotiku a druhu mikromycety (Etest technical guide). Výhodou tohoto testu je jednoduché provedení ve srovnání se standardní mikrodiluční bujónovou metodou, nevýhodou relativně vysoká cena.



Obrázek 36. E-test (*C. albicans*) Foto: V. Buchta

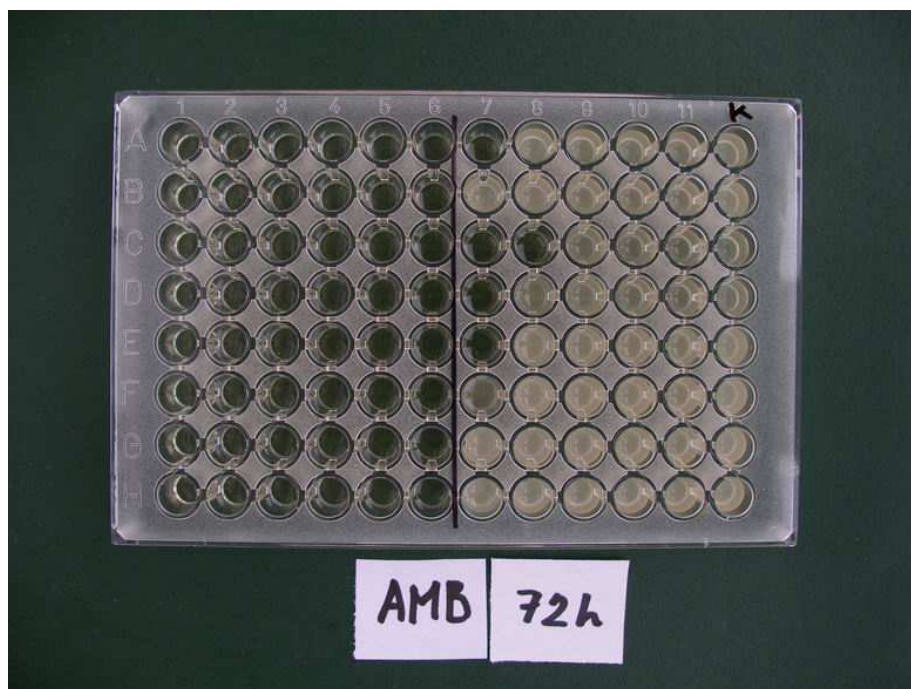
2.6.2 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda je kvantitativní test založený na testování naředěných koncentrací antimykotika v agarovém médiu, do kterého se přidává za tekutého stavu, který umožňuje je rozlít do Petriho misek. Po zatuhnutí je agar inokulován suspenzí testovaného kmene. Hodnota MIC se odečítá jako nejnižší koncentrace antimykotika v agaru, na které nedošlo k růstu mykotického agens. Kvůli své pracnosti a nákladnosti není tento test vhodný pro rutinní použití. Výhodou je obvykle lepší reprodukovatelnost výsledků.

2.6.3 Bujónová diluční metoda

Bujónovou diluční metodu lze provádět ve dvou modifikacích – jako makrodiluční bujónový test ve zkumavkách nebo mikrodiluční bujónový test v mikrotitrační destičce, který je v praxi se přednostně využíván, protože je méně náročný na provedení a spotřebu médií, antimykotik atd. Jedná se o testy kvantitativní, kterými lze stanovit hodnotu MIC a zařadit testovaný kmen do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD) nebo rezistentní (R). Zároveň lze vyočkováním na půdu bez testované látky zjistit hodnotu MFC (minimální fungicidní koncentrace). V roce 1997 schválila CLSI dokument M27-A, který standardizuje způsob provádění testů citlivosti kvasinek na

antimykotika pomocí bujónové mikrodiluční metody. Jedná se o mikrodiluční metodu s použitím média RPMI 1640 s glutaminem, bez bikarbonátů, obohacené 0,2% glukózy, hustota inokula 0,5 McFarlanda, inkubace 48 h při 35°C. Hodnotí se stupeň zákalu v jamce (buď vizuálně nebo spektrofotometricky) a interpretuje se dle stanovených kritérií (viz Tab. 4).



Obrázek 37. Mikrodiluční bujónová metoda Foto: V. Buchta

Tabulka 4. Interpretační kritéria standardu CLSI M27 – A2 (MIC v µg/ml)

	citlivý (S)	SDD*	intermediární (I)	rezistentní (R)
Flukonazol	≤ 8	16 – 32		≥ 64
Itrakonazol	≤ 0,125	0,25 – 0,5		≥ 1
Vorikonazol	≤ 1	2		≥ 4
Flucytosin	≤ 4		8 - 16	≥ 32
Echinokandiny	≤ 2**	nd	nd	nd

* SDD - citlivost závislá na dávce

** epidemiologický break-point

nd - nestanoveno

V roce 2002 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee (EUCAST – AFST) vypracovala návrh standardizovaného testování kvasinek k antimykotikům. Ačkoliv metodika

vychází ze standardu M27–A, liší se v několika parametrech: přípravě média (obsah glukózy je 2%), větší velikostí inokula, kratší době inkubace i způsobu interpretace. Přesto je míra korelace mezi oběma metodami vysoká, což dokazují některé studie (Espinell-Ingroff et al. 2005, Rodriguez-Tudela et al. 2007).

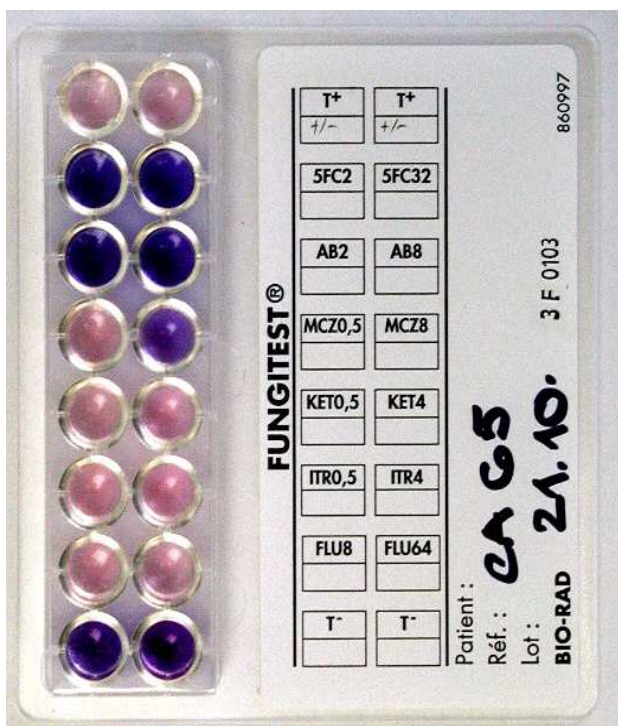
2.6.4 Komerční soupravy

V zahraničí je dostupných několik komerčních kitů založených na různých modifikacích mikrodilučních, kolorimetrických a dalších technik. Jsou to např. Sensititre Yeast One (Trek Diagnostic System, Ohio, USA), Integral System Yeasts (Liofilchem Diagnostics, Italy) nebo Candifast (International Microbio/Stago Group, Italy). Metody vykazují poměrně dobrou shodu s referenční metodou M27 – A (Morace et al. 2002).

V České republice jsou ke stanovení citlivosti k antimykotikům dostupné sady Fungitest (BioRad, Francie) a ATB fungus 3 (BioMerieux, Francie) a plně automatický systém pro identifikaci a stanovení citlivosti VITEK 2 (BioMerieux, Francie).

2.6.4.1 Fungitest (BioRad, Francie)

Fungitest umožňuje stanovit standardizovanou semikvantitativní metodou citlivost kvasinek k šesti antifungálním agens (5-fluorcytosin, amfotericin B, mikonazol, ketokonazol, itraconazol, flukonazol). Metoda vychází z referenční metody CLSI a umožňuje snadné provedení testu a jednoduchou interpretaci výsledků. V testu jsou použity dvě koncentrace (odpovídají hraničním koncentracím u standardních bujónových technik) antimykotika v dehydratovaném pufrovaném RPMI 1640 médiu s barevným pH indikátorem. Součástí testu je pozitivní (bez látek inhibujících růst) a negativní růstová kontrola (s azidem sodným). Hodnocení růstu je založeno na redukci barevného pH indikátoru, který změni barvu média z modré na růžovou jako výsledek metabolické aktivity (růstu) testovaného kmene. Pokud médium zůstane modré, antimykotikum inhibuje růst kvasinky.



Obrázek 38. Fungitest Foto: V. Buchta

2.6.4.2 ATB Fungus 3 (Biomerieux, Francie)

Test umožňuje stanovení MIC pomocí zkrácené řady koncentrací daného antimykotika; vychází ze standardu CLSI M27-A. Strip se skládá z 16 párů jamek, z nichž první pár neobsahuje žádnou antifungální látku a slouží jako pozitivní kontrola. Dalších 15 párů obsahuje pět antifungálních látek (5-fluorcytosin, amfotericin B, flukonazol, itrakonazol a vorikonazol). Do suspenzního média (0,85 % NaCl) se připraví suspenze testované kvasinky o zákalu stupně 2 podle McFarlanda, z něho se přenese 20 μ l do ATB F2 média (polotuhé živné médium) a po důkladném protřepání se pipetuje 135 μ l média do každé jamky stripu. Po inkubaci (24 h při $35 \pm 2^\circ\text{C}$ v humidní atmosféře) se odečítá nárůst kvasinky vizuálně nebo pomocí automatického čtecího systému. Výsledkem je stanovená hodnota MIC, která velice dobře shoduje s referenční metodou M27-A (Torre-Rodriguez et al. 2004).



Obrázek 39. ATB fungus 2 Foto: V. Buchta

3 CÍLE A HYPOTÉZY

3.1 Rychlé diagnostické testy

H1: Klasická metoda indukce tvorby klíčních hyf *Candida albicans* v séru má srovnatelnou senzitivitu a specifitu s alternativní metodou využívající definované médium NYP. Hlavní druhy kandid mají srovnatelný potenciál tvořit mycelium a pseudomycelium.

H2: Standardní biochemická identifikace *C. albicans* resp. *C. tropicalis* pomocí auxanogramů či komerčně dodávaných testů může být nahrazena využitím chromogenních médií. Stanovení specifity a senzitivity těchto médií.

3.2 Testování antifungální citlivosti

H3: Vyhodnocení praktické použitelnosti E-testu a diskového difúzního testu pro testování citlivosti kvasinkových izolátů k vorikonazolu a flukonazolu. Agarovou difúzní metodu (diskový test a E-test) lze použít k rutinnímu testování houbových izolátů k flukonazolu a vorikonazolu.

H4: Ověření predikční hodnoty (surrogate factor) citlivosti houbových izolátů k flukonazolu pomocí diskového difúzního testu pro rutinní skríníng vorikonazolu. Citlivost k flukonazolu lze použít jako tzv „surrogate factor“ k predikci citlivosti k vorikonazolu.

H5: Optimalizace metodiky laboratorního testování antifungální citlivosti agarovým difúzním testem na základě vyhodnocení vlivu kultivačního média (Mueller-Hintonova agaru s 2% glukózy a methylenovou modří a Antimycotic Sensitivity Test agaru) Výsledky testování citlivosti na antimykotika jsou ovlivněny složením testovacího média.

H6: Vliv metody stanovení antifungální citlivosti *in vitro* na výsledky testování patogenních hub. Výběr metody může ovlivnit výsledky a interpretaci výsledků testování antifungální citlivosti.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Houbové kmeny

Všechny primoizoláty kvasinek a vláknitých mikromycet byly kultivovány a pasážovány na Sabouraudově glukózovém agaru (Difco) s přidavkem chloramfenikolu při 35°C po 24 h u kvasinek resp. při 27°C po dobu 2 – 4 dnů u plísní.

4.1.1 Referenční kmeny

Do studie zaměřené na testování antifungální citlivosti byly zařazeny referenční kmeny z americké sbírky ATCC (American Type Culture Collection): *C. albicans* ATCC 44859, *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 a *Aspergillus fumigatus* ATCC 36607.

4.1.2 Testované kmeny

Do studií zaměřených na rychlé diagnostické testy byly zařazeny izoláty kvasinek z různých klinických materiálů (sputa, bronchoalveolární laváže, stěry z jazyka, dutiny ústní, krku, rány, vaginální výtěry, moče, aspiráty aj.) zpracovaných v mykologické laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové (viz Tab 5).

Tabulka 5. Spektrum a počet kvasinek zahrnutých do studií zaměřených na rychlé diagnostické testy

Druh	Počet (studie 1)*	Počet (studie 2)**
<i>C. albicans</i>	100	810
<i>C. famata</i>	0	1
<i>C. glabrata</i>	10	165
<i>C. guilliermondii</i>	4	5
<i>C. inconspicua</i>	5	39
<i>C. intermedia</i>	0	1
<i>C. krusei</i>	10	96
<i>C. kefyr</i>	10	29
<i>C. lusitaniae</i>	10	29
<i>C. norvegensis</i>	10	8
<i>C. parapsilosis</i>	14	21
<i>C. pelliculosa</i>	2	17
<i>C. rugosa</i>	0	2
<i>C. tropicalis</i>	15	185

<i>C. utilis</i>	0	1
<i>C. zeylanoides</i>	0	1
<i>Geotrichum candidum</i>	0	2
<i>Hansenula saturnus</i>	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	32
<i>Trichosporon asahii</i>	0	1
Celkem	200	1438

* Studie 1. Test klíčních hyf a hodnocení růstu na chromogenních médiích CandiSelect a HiCrome Candida agar

** Studie 2. Hodnocení růstu na chromogenních médiích CandiSelect a HiCrome Candida agar

Do studií zaměřených na testování citlivosti byly zahrnuty izoláty kvasinek a vláknitých hub z různých klinických materiálů zpracovaných v mykologické laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové, které byly následně zařazeny do sbírky mykologické laboratoře Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy Hradec Králové (Tab. 6). Uchovávány byly v konzervačním mléčném médiu (Becton Dickinson) při -40°C.

Tabulka 6. Spektrum a počet kvasinek zahrnutých do studií zaměřených na testování citlivosti

Druh	Počet (studie 3)*	Počet (studie 4)**
<i>C. albicans</i>	17	17
<i>C. tropicalis</i>	12	12
<i>C. glabrata</i>	12	12
<i>C. krusei</i>	12	12
<i>C. parapsilosis</i>	11	11
<i>C. lusitaniae</i>	12	11
<i>C. inconspicua</i>	10	10
<i>C. norvegensis</i>	9	10
<i>C. kefyr</i>	9	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	10
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	3	7
<i>Trichosporon</i> spp.	4	7
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13	13
<i>A. niger</i>	7	7
<i>A. flavus</i>	6	6
<i>A. terreus</i>	2	2
Celkem	149	156

* Studie 3. Srovnání diskového difúzního testu a E-testu pro testování citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu

** Studie 4. Srovnání mikrodiluční metody, E-testu, diskového difúzního testu, Fungitestu a ATB fugus testu pro testování citlivosti k flukonazolu, itraconazolu, ketokonazolu, vorikonazolu, amfotericinu B a flucytosinu

Ve studii srovnávající mikrodiluční metodu, E-test, diskový difúzní test, Fungitest a ATB fugus pro testování citlivosti k flukonazolu, itrakonazolu, ketokonazolu, vorikonazolu, amfotericinu B a flucytosinu byla naměřená data zpracována jak pro celý soubor testovaných hub tak pro zvolené podskupiny hub:

- *Aspergillus* spp: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*
- *Candida albicans*
- non-*albicans* *Candida* druhy se sníženou citlivostí k flukonazolu: *Candida glabrata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. krusei*
- non-*albicans* *Candida* druhy citlivé k flukonazolu: *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. papapsilosis*, *C. tropicalis*
- ostatní kvasinky (a kvasinkové organizmy): *Saccharomyces cerevisiae*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Trichosporon* spp.

4.2 Média

4.2.1 Kultivační média

Sabouraudův glukózový agar (Difco) byl připraven dle instrukcí výrobce a byl rozplněn do 90 mm Petriho misek (tloušťka agaru cca $4 \pm 0,2$ mm). Na tomto agaru byly kultivovány všechny primoizoláty jak z klinických materiálů, tak z konzervačního média.

4.2.2 Média pro indukci tvorby klíčních hyf

Pro test indukce tvorby klíčních hyf bylo použito čištěné bovinní sérum a definované syntetické médium NYP (Marichal et al.1986). Médium obsahuje N-acetylglukosamin (10^{-3} M), Yeast nitrogen base (3,35 g), L-prolin (10^{-3} M) a NaCl (4,5 g), pH = 6,7.

4.2.3 Chromogenní média

CandiSelect (Bio-Rad) je dodáván ve formě hotových agarových ploten. Médium obsahuje růstový základ (pepton, kvasničný extrakt, glukóza), chromogenní substrát, dvě antibiotika k potlačení růstu bakteriální flóry (chloramfenikol, gentamicin) a skladuje se při 4°C. Inokulovaná plotna se inkubuje 24–48 h při 35–37°C. Princip média CandiSelect spočívá v průkazu aktivity specifického enzymu *C. albicans*, N-acetyl- β -D-galaktosaminázy, který hydrolyzuje chromogenní substrát obsažený v médiu, což má za následek modré zbarvení kolonií. Ostatní druhy kvasinek rostou na CandiSelectu v bílých koloniích.

HiCrome Candida Agar (HiMedia) se připravuje podle instrukcí výrobce z polotovaru ve formě prášku. Médium obsahuje pepticky natrávené zvířecí tkáň, kvasničný extrakt, sladový extrakt, glukózu, chromogenní substrát a chloramfenikol. Inokulovaná plotna se inkubuje 24–48 h při 30°C. Pomocí HiCrome Candida Agar, jenž je založen na podobném principu jako CandiSelect, lze navíc identifikovat kromě *C. albicans* (kovově zelené kolonie) také kmeny *C. tropicalis* (modrozelené kolonie).

4.2.4 Média pro testování antifungální citlivosti

Pro diskový difúzní test a E-test byl použit Mueller-Hintonův agar (Difco) se 2% glukózy a 0,5 μ g/ml methylenové modři (MB) (pH $7,3 \pm 0,1$). Jeden litr

agarové báze (38 g na litr) bylo doplněno o 100 µl MB roztoku (0,1 g ve 20 ml destilované vody) a 20 g glukózy. Po autoklávování se nechalo médium vychladnout a rozplnilo se do plastických Petriho misek o průměru 90 mm (výška agaru $4\pm0,2$ mm). Ve studii 3 byl použit také Antimycotic Sensitivity Test (AST) agar (HiMedia, BioVendor), který byl připraven dle instrukcí výrobce, pH media bylo $6,6\pm0,2$.

Pro mikrodiluční bujónovou metodu byla použita dvě média. Pro testování azolů a flucytosinu bylo použito médium RPMI 1640 s L-glutaminem, bez bikarbonátů, obohacené 0,2% glukózy (Sevapharma, Praha). RPMI 1640 je přesně chemicky definované 5x koncentrované růstové médium, které se ředí vhodným pufrům (0,165 M morfolinpropansulfonová kyselina – MOPS, Sigma). pH bylo upraveno pomocí 10M NaOH na $7,0\pm0,1$. Pro amfotericin B bylo použito Antibiotic 3 médium (Becton Dickinson, USA), které není přesně chemicky definované (obsahuje pepton, hovězí extrakt, kvasničný extrakt atd.)

4.3 Antifungální látky

4.3.1 Diskový difúzní test

Pro testování byly použity papírové disky (ITESTplus, Hradec Králové) obsahující 25 µg flukonazolu, 1 µg vorikonazolu, 30 µg itraconazolu, 30 µg ketokonazolu, 50 µg amfotericinu B a 5 µg flucytosinu.

4.3.2 E-test

Ve studii byly použity E-testové proužky AB Biodisk (Solna, Švédsko) s následujícími antimykotiky (koncentrační rozmezí): flukonazol (0,016 - 256 µg/ml), vorikonazol (0,002 - 32 µg/ml), itraconazol (0,002 - 32 µg/ml), ketokonazol (0,002 - 32 µg/ml), amfotericin B (0,002 - 32 µg/ml) a flucytosin (0,002 - 32 µg/ml).

4.3.3 Mikrodiluční bujónová metoda

Všechny zásobní roztoky testovaných antimykotik byly připraveny rozpuštěním jejich práškových forem v dimetylsulfoxidu (DMSO, Sigma, Německo) - amfotericin B (Sigma, Německo), itraconazol (Sigma, Německo), ketokonazol (Sigma, Německo) resp. ve sterilní vodě – flukonazol (Sigma, Německo), vorikonazol (Toronto Research Chemicals Inc., Kanada), flucytosin

(Fluka, Německo). Testovaná koncentrační rozmezí: flukonazol (0,063 – 64 µg/ml), vorikonazol (0,031 – 32 µg/ml), itrakonazol (0,016 – 16 µg/ml), ketokonazol (0,016 – 16 µg/ml), amfotericin B (0,031 – 32 µg/ml) a flucytosin (0,063 – 64 µg/ml).

4.4 Metody

4.4.1 Druhová identifikace kvasinek

Standardní druhová identifikace kvasinkových izolátů byla provedena pomocí cukerných auxanogramů (ITESTplus, Hradec Králové), růstu na kukuřičném agaru (Corn-Meal Agar, Difco) a eskulinového testu.

4.4.1.1 Auxanogram

Cukerný auxanogram se připravuje z izolovaných kolonií kvasinek narostlých na SGA. V Petriho misce o průměru 90 mm se připraví suspenze daného kmene kvasinky v 1,5 ml YNB média (Yeast Nitrogen Base, Difco) a následně se zalije čistým agarem o teplotě 40 až 50°C tak, aby celkový objem média byl 15 ml (ředění 10×). Přitom se miskou intenzivně krouží a pohupuje, aby se inokulum rozptýlilo po celé misce. Po ztuhnutí agarů se na povrch položí disky (5 na misku) obsahující jednotlivé cukry nebo cukerné alkoholy. Po 24 h – 72 h inkubaci ve 26 ± 1°C se odečítá výsledek – nárůst kvasinky se projeví kruhovitým mléčným zakalením v okolí disku. Zastoupení užívaných cukrů je pro jednotlivé druhy kvasinek charakteristické.

4.4.1.2 Hodnocení morfologie na kukuřičném agaru

Testovaná kultura se naočkuje na povrch kukuřičného agarů (Corn-Meal Agar, Difco) v Petriho misce a inkubuje se v termostatu při 27°C po dobu 24 – 72 h. Přítomnost a charakter tvorby pseudomycelia resp. chlamydospor se zjišťuje přímou mikroskopií kultury (zvětšení 200 – 400×).

4.4.2 Test klíčnicích hyf

K testování indukce tvorby klíčnicích hyf bylo použito jednak bovinní sérum a jednak definované syntetické médium NYP. Z každého testovaného izolátu byly připraveny suspenze v 0,5 ml séra resp. v 0,5 ml NYP média, které byly následně inkubovány 3-4 hodiny při 37°C. Schopnost indukovat tvorbu klíčnicích

hyf resp. pseudohyf byla hodnocena mikroskopicky. Kvantita jednotlivých morfologických forem byla hodnocena na 1 až 4 kříže:

0-25%	+
26-50%	++
51-75%	+++
76-100%	++++

4.4.3 Testování antifungální citlivosti

4.4.3.1 Příprava suspenzí

Suspenze kvasinek byly připraveny z 24 h starých kolonií narostlých na SGA homogenizací malého inokula ve sterilním fyziologickém roztoku. Suspenze vláknitých mikromycet byly připraveny ze 3 až 5 dnů starých kolonií narostlých na SGA resuspendací konidií ve sterilním fyziologickém roztoku s kapkou Tweenu 80 (Sigma). Velikost inokula pro diskový difúzní test a E-test byla nastavena na 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice s využitím denzitometru (Densi-La-Metr, Lachema-Pliva). Pro mikrodiluční bujónovou metodu byla velikost inokula určena pomocí Búrkerovy komůrky na $0,5 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^3$ kvasinkových buněk/ml resp. $0,5 \times 10^4$ – 5×10^4 konidií /ml.

4.4.3.2 Diskový difúzní test

Plotny s MH resp. AST agarem byly inokulovány přelitím suspenzí testované houby a přebytek suspenze odsán. Na jednu misku s MH agarem byly položeny vždy 3 disky od jednoho antimykotika. Plotny byly inkubovány při 35°C po dobu 48 h. Průměr inhibiční zóny byl odečítán po 24 h a 48h v místě, kde došlo k náhlému poklesu (přibližně o 80% a více) růstu projevujícím se snížením velikosti, počtu a hustoty kolonií. Z každého tripletu naměřených průměrů inhibičních zón u diskového testu byl vypočten geometrický průměr, který byl použit ke statistickým výpočtům.

4.4.3.3 E-test

Plotny s MH agarem byly inokulovány přelitím suspenzí testované houby a přebytek suspenze odsán. E-testové proužky byly asepticky pokládány vždy po jednom na povrch agarové plotny. Inkubace probíhala v humidní atmosféře při 35°C po dobu 48 h. Hodnota MIC byla odečítána dle kritérií stanovených výrobcem (ERG 002, AB Biodisk) po 24 a 48 h.

4.4.3.4 Mikrodiluční bujónová metoda

Finální koncentrační řada testovaného antimykotika byla připravena v RPMI 1640 pufrovaném 0,165M MOPS. Pro testování byly použity mikrotitrační destičky s 96-ti jamkami s plochým dnem (typ P). Do každé jamky bylo pipetováno 200 μ l naředěného antimykotika resp. samotného RPMI s MOPS (kontrola) a 10 μ l suspenze. Inkubace probíhala 48 h při 35°C. Hodnota MIC byla odečítána dle stupně zákalu v jamce (jak vizuálně tak pomocí spektrofotometru (iEMS Reader, Labsystems) při 540 nm) a byla stanovena jako nejnižší koncentrace antimykotika v jamce, kde došlo k alespoň 80% inhibici růstu houby oproti kontrole (IC_{80}) resp. 95% inhibici u amfotericinu B (IC_{95}).

4.4.3.5 ATB fungus

Strip byl inokulován a dle instrukcí výrobce. Do suspenzního média (0,85 % NaCl) byla připravena suspenze testované kvasinky resp. plísně o zákalu stupně 2 podle McFarlanda, z něho bylo přeneseno 20 μ l do ATB F2 média (polotuhé živné médium) a po důkladném protřepání bylo 135 μ l média napipetováno do každé jamky stripu. Po inkubaci (24 h při 35 \pm 2°C v humidní atmosféře) byl odečten nárůst kvasinky resp. plísně oproti kontrole. Výsledkem byla hodnota MIC pro dané antimykotikum. V naší studii byl použit strip ATB fungus 2 obsahující flucytosin, amfotericin B, flukonazol a itraconazol. V současnosti firma vyrábí ATB fungus 3, který navíc obsahuje vorikonazol.

4.4.3.6 Fungitest

Strip byl inokulován a dle instrukcí výrobce. Do sterilní destilované vody byla připravena suspenze testovaného kmene houby o zákalu stupně 1 podle McFarlanda. 100 μ l této suspenze bylo přidáno do 1,9 ml do sterilní destilované vody a po promíchání bylo 20 μ l napipetováno do 3 ml předpřipraveného RPMI 1640 suspenzního média. Takto získané finální inokulum o koncentraci 10³ CFU/ml bylo pipetováno v množství 100 μ l do každé jamky. Strip byl inkubován při 37°C a výsledek byl odečítán po 48 h. Ačkoliv se jedná o test semikvantitativní a výsledkem je zařazení citlivosti dané houby do kategorií citlivý, citlivý v závislosti na dávce a rezistentní, v naší studii jsme přiřadili těmto kategoriím hodnoty dle následujícího schématu:

- výsledek v kategorii rezistentní – hodnota vyšší testované koncentrace (flukonazol – 64 µg/ml, itraconazol – 4 µg/ml, ketokonazol – 4 µg/ml, mikonazol – 8 µg/ml, amfotericin B – 8 µg/ml, flucytosin – 32 µg/ml)
- výsledek v kategorii citlivý - hodnota nižší testované koncentrace (flukonazol – 8 µg/ml, itraconazol – 0,5 µg/ml, ketokonazol – 0,5 µg/ml, mikonazol – 0,5 µg/ml, amfotericin B – 2 µg/ml, flucytosin – 2 µg/ml)
- výsledek v kategorii citlivý v závislosti na dávce (SDD) – hodnota v polovině mezi testovanými koncentracemi (flukonazol - 24 µg/ml, itraconazol – 2 µg/ml, ketokonazol – 2 µg/ml, mikonazol – 4 µg/ml, amfotericin B – 4 µg/ml, flucytosin – 16 µg/ml)

4.4.3.7 Interpretační kritéria a statistické hodnocení testů citlivosti k antifungálním látkám

Pro jednotlivá antimykotika a druhy testovaných hub nebo jejich skupiny (viz kapitola 4.1.2) byly stanoveny, pokud to počty testovaných kmenů dovozovaly, základní statistické parametry jako geometrický průměr MIC resp. inhibičních zón, rozsah jejich hodnot (maximální a minimální hodnota) a indexy IC₅₀ a IC₉₀, které určovaly maximální hodnotu MIC (v µg/ml) pro 50% resp. 90% testovaných kmenů u kvantitativních testů nebo minimální velikost inhibiční zóny (v mm) pro stejný počet kmenů u diskového testu.

Tam, kde to bylo možné a vhodné byl rovněž kalkulován Spearmanův korelační koeficient, koeficient vyjadřující míru lineární souvislosti mezi jednotlivými metodami testování antifungální citlivosti.

Výsledky testů citlivosti byly interpretovány podle mezinárodně doporučených kritérií (break-points) nebo arbitrálně na základě předchozích vlastních zkušeností v mykologické laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové (Tab. 7). Každý kmen tak byl zařazen do jedné ze tří kategorií: citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD) resp. intermediární (I) nebo rezistentní (R).

Výsledky testování antifungální citlivosti mezi jednotlivými metodami ve smyslu výše uvedených kategorií byly hodnoceny jako:

- shoda

- malá neshoda* (angl. minor error) výsledky jednotlivých metod se liší o jednu kategorii, tj. S-SDD/I nebo SDD/I-R
- velká neshoda* (angl. major error): výsledek referenční metody (bujónová diluce) spadá do kategorie citlivý a výsledek testované metody je v kategorii rezistentní (falešná rezistence)
- velmi velká neshoda* (angl. very major error): výsledek referenční metody je v kategorii rezistentní a výsledek testované metody je v kategorii citlivý (falešná citlivost)

Dále byla stanovena:

- prediktivní hodnota - predikce shody diskového difúzního testu s E-testem (%)
- celková shoda - % shody testů pro všechny tři kategorie

K základní statistické analýze byl použit program Excel.

Pro vyhodnocení dat získaných porovnáním metod testování antifungální citlivosti k antimykotikům byl použit program NCSS 2007, Statistica.

*pozn. Pro stanovení tzv. surrogate faktoru (predikce citlivosti vorikonazolu podle výsledku citlivosti k flukonazolu) byly neshody definovány následovně:

- malá neshoda (angl. minor error) výsledky stanovení citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu se liší o jednu kategorii, tj. S-SDD/I nebo SDD/I-R
- velká neshoda (angl. major error): výsledek citlivosti k flukonazolu spadá do kategorie rezistentní a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii citlivý
- velmi velká neshoda (angl. very major error): výsledek citlivosti k flukonazolu je v kategorii citlivý a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii rezistentní

Tabulka 7. Interpretační kritéria pro testované antifungální látky

ATM	Mikrodiluce (µg/ml)			E-test (µg/ml)			Diskový difúzní test (mm)		
	S	I	R	S	I/ SDD*	R	S	I	R
FLZ	≤ 8	16 - 32*	≥ 64	≤ 8	12 - 48*	≥ 64	≤ 14	14,5 -18,5	≥ 19
VOR	≤ 1	1,5 - 3*	≥ 4	≤ 1	1,5 - 3*	≥ 4	≤ 13	13,5 -16,5	≥ 17
ITR	≤ 0,125	0,25-0,5*	≥ 1	≤ 0,125	0,19-0,75*	≥ 1	≤ 11,5	12 - 13,5	≥ 14
KET	≤ 0,5	1 - 3	≥ 4	≤ 0,5	0,75 - 3	≥ 4	≤ 14,5	15 - 19,5	≥ 20
AmB	≤ 0,5	1	≥ 2	≤ 0,5	0,75 -1,5	≥ 2	≤ 8	8,5 - 9,5	≥ 10
5FC	≤ 4	8 - 16	≥ 32	≤ 4	6 - 24	≥ 32	≤ 14,5	15 - 19,5	≥ 20

ATM – antimykotikum, FLZ – flukonazol, VOR – vorikonazol, ITR – itrakonazol, KET – ketokonazol, AmB – amfotericin B, 5FC – flucytosin

S – citlivý, I – intermediárně citlivý, R – rezistentní, * - SDD (citlivost závislá na dávce)

5 VÝSLEDKY

5.1 Rychlé diagnostické testy

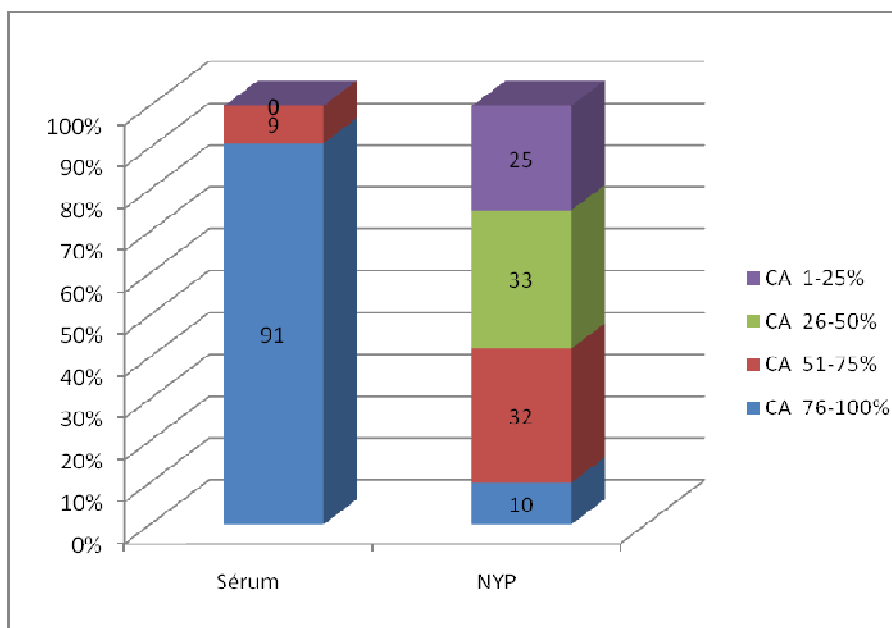
5.1.1 Test tvorby klíčních hyf

Výsledky testu indukce tvorby klíčních hyf shrnuje Tab. 8. Všechny kmeny *C. albicans* tvořily klíčící hyfy jak v séru, tak v médiu NYP. Tvorba pseudohyf byla u *C. albicans* pozorována u přibližně 1/3 izolátů, zatímco v případě *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* a *C. kefyr* dominovala u převážné většiny kmenů (Tab. 8). U dvou kmenů *C. tropicalis* (13,3%) byla v séru zaznamenána tvorba klíčních hyf, nikoliv však v médiu NYP. Bližší vyhodnocení ukázalo kvantitativní rozdíly v proporčním výskytu jak klíčních hyf (viz Graf 1), tak jednotlivých pseudohyf (viz Graf 2) a pseudomycelia v médiu NYP. V séru u 91% testovaných kmenů *C. albicans* konvertovala většina blastospor (>75%) v klíčící hyfy, zatímco v NYP médiu jen u 10% kmenů (Graf 1).

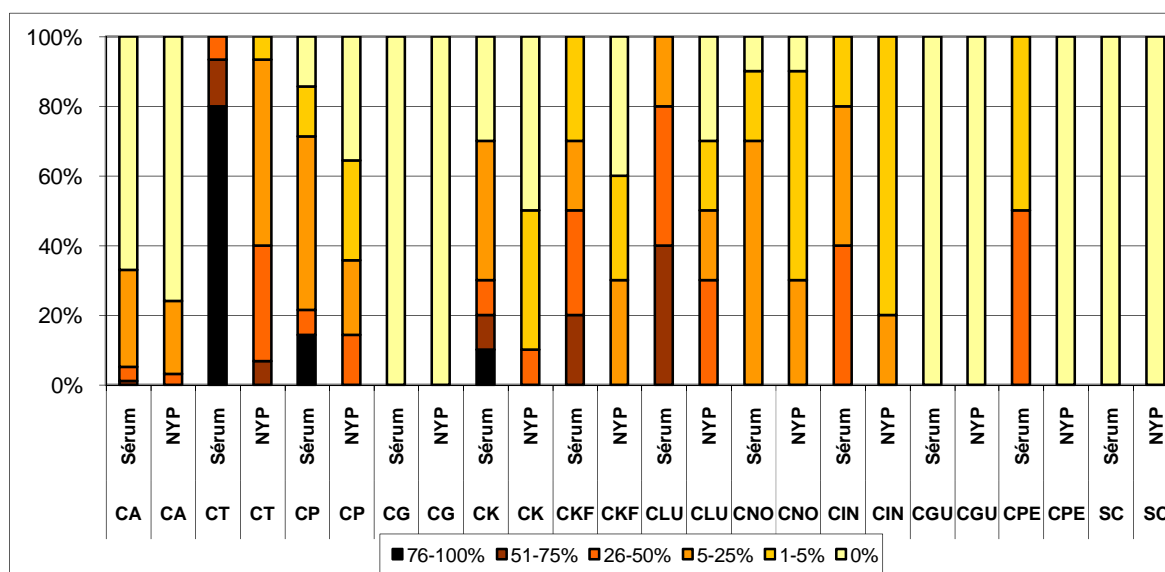
Tabulka 8. Srovnání tvorby klíčních hyf, pseudohyf a pseudomycelia v závislosti na použitém indukčním médiu a podle druhu kvasinky

Druh	N	Klíčící hyfy				Pseudohyfy				Pseudomycelium			
		sérum		NYP		sérum		NYP		sérum		NYP	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CA	100	100	100	100	100	33	33	24	24	0	0	1	1
CT	15	0	0	0	0	15	100	15	100	10	67	6	40
CP	14	0	0	0	0	12	86	9	64	13	93	11	79
CG	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CK	10	0	0	0	0	7	70	5	50	5	50	1	10
CKF	10	0	0	0	0	10	100	6	60	2	20	0	0
CLU	10	0	0	0	0	10	100	3	30	7	70	0	0
CNO	10	0	0	0	0	8	80	4	40	5	50	0	0
CIN	5	0	0	0	0	5	100	3	60	5	100	1	20
CGU	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CPE	2	0	0	0	0	2	100	1	50	0	0	1	50
SC	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CA = *C. albicans*, CT = *C. tropicalis*, CG = *C. glabrata*, CK = *C. krusei*, CP = *C. parapsilosis*, CKF = *C. kefyr*, CLU = *C. lusitaniae*, CNO = *C. norvegensis*, CIN = *C. inconspicua*, CGU = *C. guilliermondii*, CPE = *C. pelliculosa*, SC = *Saccharomyces cerevisiae*, N = celkový počet testovaných kmenů, n = počet kmenů tvořících klíčící hyfy/pseudohyfy/pseudomycelium, NYP = syntetické indukční médium



Graf 1. Srovnání kvantitativního zastoupení klíčních hyf u kmenů *C. albicans* v séru a indukčním médiu NYP



Graf 2. Srovnání kvantitativního zastoupení pseudohyf u kmenů *C. albicans* v séru a indukčním médiu NYP

5.1.2 Růst na chromogenních médiích I

Všech 100 izolátů *C. albicans* narostlo na CandiSelectu v charakteristických modrých koloniích, ostatní kvasinky narostly v koloniích bílých (viz Tab. 9). Specifita i senzitivita identifikace *C. albicans* na CandiSelectu byla 100% (viz Tab. 10).

Na HiCrome Candida Agar narostlo všech 100 izolátů *C. albicans* uniformně jako světle zelené kolonie s kovovým leskem. Všechny kmeny *C. tropicalis* (n=15) vytvářely modrozelené matné kolonie. Specifita i senzitivita tohoto agaru pro stanovení *C. albicans* i *C. tropicalis* byla 100% (viz Tab. 10).

Tabulka 9. Výsledky hodnocení růstu kvasinek na chromogenních médiích

Médium	CandiSelect Agar					HiCrome Candida Agar					
Druh	n	M	%	B	%	Z+KL	%	MZ	%	B	%
CA	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0
CT	15	0	0	15	100	0	0	15	100	0	0
CP	14	0	0	14	100	0	0	0	0	14	100
CG	10	0	0	10	100	0	0	0	0	10	100
CK	10	0	0	10	100	0	0	0	0	10	100
CKF	10	0	0	10	100	0	0	0	0	10	100
CLU	10	0	0	10	100	0	0	0	0	10	100
CNO	10	0	0	10	100	0	0	0	0	10	100
CIN	5	0	0	5	100	0	0	0	0	5	100
CGU	4	0	0	4	100	0	0	0	0	4	100
CPE	2	0	0	2	100	0	0	0	0	2	100
SC	10	0	0	10	100	0	0	0	0	10	100

CA = *C. albicans*, CT = *C. tropicalis*, CG = *C. glabrata*, CK = *C. krusei*, CP = *C. parapsilosis*, CKF = *C. kefyr*, CLU = *C. lusitanae*, CNO = *C. norvegensis*, CIN = *C. inconspicua*, CGU = *C. guilliermondii*, CPE = *C. pelliculosa*, SC = *Saccharomyces cerevisiae*, n = celkový počet, M = modrá barva, B = bílá barva, Z+KL = zelená barva s kovovým leskem, MZ = modrozelená barva

Tabulka 10. Specifita a senzitivita testu klíčních hyf a hodnocení růstu na chromogenních médiích u testovaných kmenů *C. albicans* a *C. tropicalis*

Test	CandiSelect	HiCrome		KH - sérum	KH - NYP
Druh	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
Specifita (%)	100	100	100	99	100
Senzitivita (%)	100	100	100	100	100

KH = klíční hyfy

5.1.3 Růst na chromogenních médiích II

Na základě výsledků získaných v předchozí studii, jsme se rozhodli otestovat chromogenní média na větším (reprezentativnějším) počtu kvasinek.

V této studii jsme opět použili chromogenní agary CandiSelect a HiCrome a to k identifikaci jednotlivých kvasinkových izolátů narostlých v čisté kultuře, nikoliv k primoizolaci. Agarová plotna byla rozdělena na 16 dílů. Na jeden díl plotny byly vždy inokulovány 3-4 kolonie jednoho izolátu formou krátké inokulační čáry. Tímto způsobem jsme na jednom chromogenním agaru otestovali až 16 různých kvasinkových izolátů. Barva byla hodnocena po 24, 48 a 72 h.

Výsledky této studie shrnuje Tab. 11. Z 810 izolátů *C. albicans* bylo 98,27% modrých na CandiSelectu (CS) a 99,87% zelených s kovovým leskem na HiCrome agaru (HCA). Na CS narostlo v bílých koloniích 13 izolátů a jeden izolát narostl v bílých koloniích jak na CS, tak na HCA. Kromě těchto 14 falešně negativních izolátů (1,33%) byl na CS zaznamenán i jeden falešně pozitivní (0,16%). Jednalo se o jeden izolát *C. tropicalis*, který narostl na CS v modrých koloniích. Na HCA lze identifikovat i *C. tropicalis*. Ze 185 testovaných izolátů *C. tropicalis* narostlo na HCA 97,30% v modrozelených koloniích. Pět izolátů (0,16%) tvořilo kolonie bílé barvy. Kromě těchto pěti falešně negativních izolátů byly nalezeny i dva (2,7%) falešně pozitivní. Jeden izolát *C. famata* a jeden *C. kefyr* narostly na HCA rovněž v modrozelených koloniích.

Tabulka 11. Výsledky hodnocení růstu kmenů *C. albicans* a *C. tropicalis* na chromogenních médiích

	CandiSelect		HiCrome agar			
	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	n	%	n	%	n	%
pozitivní	796	98,27	809	99,87	180	97,30
negativní	627	99,84	628	100	1251	99,84
falešně pozitivní	1	0,16	0	-	2	2,70
falešně negativní	14	1,73	1	0,13	5	0,16

Tabulka 12. Senzitivita a specificita testů pro kmeny *C. albicans* a *C. tropicalis* na chromogenních médiích

	CandiSelect	HiCrome agar	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
Senzitivita (%)	98,27	99,87	97,30
Specificita (%)	99,84	100	99,84
PPV (%)	99,87	100	98,90
NPV (%)	97,82	99,84	99,60

PPV = pozitivní prediktivní hodnota, NPV = negativní prediktivní hodnota

Součástí experimentů bylo studium vlivu délky a teploty inkubace na zbarvení kolonií kvasinek na obou chromogenních agarech. Délka inkubace na obou médiích nehrála roli, k významné změně barvy během prodloužené inkubace nedocházelo. Zvýšení teploty z 30°C na 37°C u HiCrome Candida Agar nemělo viditelný vliv na zbarvení kolonií. Naproti tomu, u CandiSelect média, pokud byla doporučená teplota (35-37°C) snížena na 28°C, charakteristické modré zbarvení *C. albicans* se změnilo na nespecifické odstíny bělošedé barvy. Kontrola inkubační teploty u CandiSelect média je proto důležitá pro správný odečet testu.

5.2 Testování antifungální citlivosti

5.2.1 Srovnání diskového difúzního testu a E-testu pro testování citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu

Cílem bylo srovnat praktickou použitelnost E-testu a diskového testu pro testování citlivosti houbových izolátů k vorikonazolu ve srovnání s flukonazolem.

Po stanovení hodnot MIC a průměrů inhibičních zón u jednotlivých kmenů hub byly výsledky testů citlivosti zařazeny dle interpretačních kritérií (Tab. 7) do kategorií citlivý, citlivý v závislosti na dávce (SDD) nebo rezistentní. Data byla dále porovnávána s následným stanovením parametrů ukazujících vzájemné vztahy mezi metodami: neshody (malá, velká, velmi velká), prediktivní hodnota, celková shoda.

Výsledky studie odpovídaly typickému *in vitro* spektru aktivity vorikonazolu, který zahrnuje aspergily a vzácnější rody vláknitých hub

(*Fusarium*, *Scedosporium*) a kvasinky, včetně druhů s primárně sníženou nebo variabilní citlivostí k flukonazolu (*Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Jeu et al. 2003, Johnson a Kauffman 2003, Perfect et al. 2003).

Porovnání diskového testu a E-testu ukázalo u našeho souboru kvasinek a vláknitých hub velmi dobrou celkovou shodu v citlivosti většiny kmenů testovaných hub k vorikonazolu (pokud jde o jednotlivé kategorie) (Tab. 14). U flukonazolu bylo procento celkové shody o něco nižší, s čímž koresponduje i větší výskyt chyb u všech kategorií (Tab. 13).

Vyhodnocení možnosti využít flukonazol jako tzv. surrogate faktor předjímající *in vitro* citlivost resp. rezistenci k vorikonazolu ukázalo velmi dobrou predikční hodnotu pro flukonazol v kategorii citlivý a citlivý v závislosti na dávce, avšak ne pro kategorii rezistentní (Tab. 16 a 17).

Tabulka 13. Srovnání shody výsledků testování citlivosti k flukonazolu E-testem a diskovým difúzním testem.

Metoda			E-test - 48h			Prediktivní hodnota	Celková shoda	Neshody					
Diskový test	Čas	Kategorie	S	SDD	R	%	%	MN		VN		VVN	
	24h	S	51	17	4	70,8	74,8	32	22,4	0	-	4	2,8
		SDD	0	9	9	50,0							
		R	0	6	47	88,7							
	48h	S	49	12	2	77,8	75,5	33	23,1	0	-	2	1,4
		SDD	2	8	7	47,1							
		R	0	12	51	81,0							

S – citlivý, SDD – citlivý v závislosti na dávce, R – rezistentní; MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 14. Srovnání shody výsledků testování citlivosti k vorikonazolu E-testem a diskovým difúzním testem.

Metoda			E-test - 48h			Prediktivní hodnota	Celková shoda	Neshody					
Diskový test	Čas	Kategorie	S	SDD	R	%	%	MN		VN		VVN	
	24h	S	130	11	1	91,5	90,5	14	9,5	0	-	1	0,7
		SDD	1	2	0	66,7							
		R	0	1	2	66,7							
	48h	S	124	7	1	93,9	89,2	14	9,5	1	0,7	1	0,7
		SDD	6	6	0	50,0							
		R	1	1	2	50,0							

S – citlivý, SDD – citlivý v závislosti na dávce, R – rezistentní; MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 15. Vliv metody testování a doby odečtu na shodu výsledků citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu pomocí E-testu a diskového testu

Metoda			E-test - 48h Vorikonazol			Prediktivní hodnota*	Celková shoda	Neshody					
			S	SDD	R	%	%	MN		VN		VVN	
Disk test Flukonazol	Čas	Kategorie	S	SDD	R	%	%	n	%	n	%	n	%
	24h	S	62	7	1	88,6	47,6	27	18,9	47	32,9	1	0,7
		SDD	16	4	0	20,0							
		R	47	4	2	3,8							
	48h	S	56	6	1	88,9	44,1	26	18,2	53	37,1	1	0,7
		SDD	13	4	0	23,5							
		R	53	7	3	4,8							

Metoda			Etest - 48h Vorikonazol			Prediktivní hodnota*	Celková shoda	Neshody					
			S	SDD	R	%	%	MN		VN		VVN	
E-test Flukonazol	Čas	Kategorie	S	SDD	R	%	%	n	%	n	%	n	%
	24h	S	60	6	1	89,6	46,9	38	25,7	36	24,3	1	0,7
		SDD	30	5	0	14,3							
		R	36	3	2	4,9							
	48h	S	47	3	1	92,2	37,1	39	27,3	51	35,7	1	0,7
		SDD	28	4	0	12,5							
		R	50	8	2	3,3							

S – citlivý, SDD – citlivý v závislosti na dávce, R – rezistentní; MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

* do jaké míry (v %) lze předvídat výsledek (tzv. surrogate factor) in vitro testování vorikonazolu na základě citlivosti k flukonazolu

Tabulka 16. Predikce (surrogate factor) výsledků testování citlivosti k vorikonazolu na základě výsledků testování k flukonazolu pomocí diskového testu po 24 h

Druh skupina	Počet izolátů	Prediktivní hodnota (%)					Celková shoda	Neshody					
								MN		VN		VVN	
		P _S	P _{SDD}	P _R	P _{S+}	P _{SDD+}		%	n	%	n	%	n
CA	15	100	0	0	100	100	93,3	1	6,7	0	-	0	-
CG	12	100	0	50,0	100	11,1	33,3	7	58,3	1	8,3	0	-
nonCA	84	97,8	0	8,3	98,3	56,4	32,2	16	19,0	22	26,2	0	-
nonCA-FS	43	97,6	0	0	97,6	50,0	93,0	2	4,6	1	2,3	0	-
nonCa-FR	41	100	0	8,7	100	56,8	14,6	14	34,1	21	51,2	0	-
Candida	99	98,3	0	8,0	98,6	57,5	60,6	17	17,1	22	22,2	0	-
Kvasinky	115	98,6	0	8,0	98,9	53,5	63,5	20	17,4	22	19,1	0	-

CA – *C. albicans*, CG – *C. glabrata*, nonCA – non-*albicans Candida* druhy, nonCA-FS – non-*albicans Candida* druhy citlivé k flukonazolu, nonCA-FR – non-*albicans Candida* druhy se sníženou citlivostí k flukonazolu, Candida – *Candida* spp., Kvasinky – *Candida* spp. plus *B. capitatus* (n = 3) plus *Trichosporon* spp. (n = 3) plus *S. cerevisiae* (n = 10)

P_S, P_{SDD}, P_R – pravděpodobnost výsledku citlivosti k vorikonazolu shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD) a rezistentní (R)

P_{S+} - pravděpodobnost výsledku vorikonazol citlivý (S) shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý (S) a citlivý v závislosti na dávce (SDD)

P_{SDD+} - pravděpodobnost výsledku vorikonazol citlivý v závislosti na dávce (SDD) shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý v závislosti na dávce (SDD) a rezistentní (R)

MN - malá neshoda - výsledky stanovení citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu se liší o jednu kategorii, tj. S-SDD/I nebo SDD/I-R

VN - velká neshoda - výsledek citlivosti k flukonazolu spadá do kategorie rezistentní a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii citlivý

VVN - velmi velká neshoda - výsledek citlivosti k flukonazolu je v kategorii citlivý a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii rezistentní

Tabulka 17. Predikce (surrogate factor) výsledků testování citlivosti k vorikonazolu na základě výsledků testování k flukonazolu pomocí E-testu po 48 h

Druh skupina	Počet izolátů	Prediktivní hodnota (%)					Celková shoda	Neshody					
								MN		VN		VVN	
		P _S	P _{SDD}	P _R	P _{S+}	P _{SDD+}		%	n	%	n	%	n
CA	15	100	0	0	100	33,3	80,0	3	20,0	0	-	0	-
CG	12	0	40,0	20,0	42,9	60,0	25,0	8	66,7	1	8,3	0	-
nonCA	84	87,5	18,2	6,5	85,2	61,5	23,8	27	32,1	22	26,2	1	1,2
nonCA-FS	43	93,3	10,0	0	92,5	30,8	67,4	13	30,2	0	-	1	2,3
nonCa-FR	41	0	25,0	7,4	64,3	71,8	12,2	14	34,1	22	53,7	0	-
Candida	99	90,9	16,7	6,5	88,2	60,0	46,5	30	30,3	22	22,2	1	1,0
Kvasinky	115	92,2	12,5	6,3	90,4	53,1	46,1	38	33,0	23	20,0	1	0,9

CA – *C. albicans*, CG – *C. glabrata*, nonCA – non-*albicans Candida* druhy, nonCA-FS – non-*albicans Candida* druhy citlivé k flukonazolu, nonCA-FR – non-*albicans Candida* druhy se sníženou citlivostí k flukonazolu, Candida – *Candida* spp., Kvasinky – *Candida* spp. plus *B. capitatus* (n = 3) plus *Trichosporon* spp. (n = 3) plus *S. cerevisiae* (n = 10)

P_S, P_{SDD}, P_R – pravděpodobnost výsledku citlivosti k vorikonazolu shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD) a rezistentní (R)

P_{S+} - pravděpodobnost výsledku vorikonazol citlivý (S) shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý (S) a citlivý v závislosti na dávce (SDD)

P_{SDD+} - pravděpodobnost výsledku vorikonazol citlivý v závislosti na dávce (SDD) shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý v závislosti na dávce (SDD) a rezistentní (R)

MN - malá neshoda - výsledky stanovení citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu se liší o jednu kategorii, tj. S-SDD/I nebo SDD/I-R

VN - velká neshoda - výsledek citlivosti k flukonazolu spadá do kategorie rezistentní a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii citlivý

VVN - velmi velká neshoda - výsledek citlivosti k flukonazolu je v kategorii citlivý a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii rezistentní

Tabulka 18. Predikce (surrogate factor) výsledků testování citlivosti k vorikonazolu E-testem po 48 h na základě výsledků testování k flukonazolu pomocí diskového testu po 24 h

Druh	Počet izolátů	Prediktivní hodnota (%)					Celková shoda	Neshody					
								MN		VN		VVN	
		P _S	P _{SDD}	P _R	P _{S+}	P _{SDD+}		%	n	%	n	%	n
CA	15	100	0	0	100	100	93,3	1	6,7	0	-	0	-
CG	12	0	42,9	50,0	40,0	44,4	33,3	8	66,7	0	-	0	-
nonCA	84	82,2	26,7	8,3	80,0	66,7	30,1	18	21,4	23	27,4	1	1,2
nonCA-FS	43	87,8	100	0	85,7	100	86,0	4	9,3	1	2,3	1	2,3
nonCa-FR	41	25,0	21,4	8,7	66,7	64,9	14,6	14	34,1	22	53,7	0	-
Candida	99	86,4	26,7	8,0	83,8	67,5	57,6	19	19,2	23	23,2	1	1,0
Kvasinky	115	88,6	20,0	8,0	86,7	60,0	59,1	24	20,9	23	20,0	1	0,9

CA – *C. albicans*, CG – *C. glabrata*, nonCA – non-*albicans Candida* druhy, nonCA-FS – non-*albicans Candida* druhy citlivé k flukonazolu, nonCA-FR – non-*albicans Candida* druhy se sníženou citlivostí k flukonazolu, Candida – *Candida* spp., Kvasinky – *Candida* spp. plus *B. capitatus* (n = 3) plus *Trichosporon* spp. (n = 3) plus *S. cerevisiae* (n = 10)

P_S, P_{SDD}, P_R – pravděpodobnost výsledku citlivosti k vorikonazolu shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD) a rezistentní (R)

P_{S+} - pravděpodobnost výsledku vorikonazol citlivý (S) shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý (S) a citlivý v závislosti na dávce (SDD)

P_{SDD+} - pravděpodobnost výsledku vorikonazol citlivý v závislosti na dávce (SDD) shodující se s flukonazolem v kategorii citlivý v závislosti na dávce (SDD) a rezistentní (R)

MN - malá neshoda - výsledky stanovení citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu se liší o jednu kategorii, tj. S-SDD/I nebo SDD/I-R

VN - velká neshoda - výsledek citlivosti k flukonazolu spadá do kategorie rezistentní a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii citlivý

VVN - velmi velká neshoda - výsledek citlivosti k flukonazolu je v kategorii citlivý a výsledek citlivosti k vorikonazolu je v kategorii rezistentní

5.2.2 Srovnání mikrodiluční metody, E-testu, diskového difúzního testu, Fungitestu a ATB fugus testu pro testování citlivosti k flukonazolu, itrakonazolu, ketokonazolu, vorikonazolu, amfotericinu B a flucytosinu

Výsledky testování referenčních kmenů *C. albicans* ATCC 44859, *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 a *Aspergillus fumigatus* ATCC 36607 byly v rozmezí publikovaných limitů (NCCLS 2004, 2004, Barry et al. 2003, Pfaller et al. 2004).

Základní statistické údaje (geometrický průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota, medián (IC_{50}) a 0,9 percentil (IC_{90}) naměřených dat jsou shrnuty v následujících tabulkách. Údaje jsou zpracovány pro jak pro celý soubor testovaných kmenů hub (Tab. 19 (pro 24 h) a Tab. 25 (pro 48 h) , tak pro definované kategorie hub Tab. 20 – 24 (pro 24 h) a Tab. 26 – 30 (pro 48 h).

Tabulka 19. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro celý soubor (n=156) houbových kmenů po 24 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	7,13	0,48	0,40	0,15	0,23	0,49	12,54	0,35	0,16	0,13	0,13	5,81	18,80	16,58	27,94	28,12	14,97	21,81	6,27	0,27	0,61	1,16
SD	51,951	6,077	4,012	5,100	0,551	13,683	179,749	7,690	1,915	0,655	2,224	28,752	10,378	4,091	7,254	7,948	3,665	13,578	70,321	1,289	3,569	16,600
Min	0,125	0,031	0,016	0,031	0,031	0,063	0,38	0,008	0,006	0,008	0,003	0,125	6	7	11	6	6,5	6	0,125	0,125	0,5	0,5
Max	128	32	32	64	4	128	512	64	12	6	16	64	43	31	44	46	25,5	54	256	8	32	128
IC50	8	0,5	0,5	0,125	0,25	0,25	12	0,5	0,19	0,125	0,125	4	23,75	16	29,5	28,5	15	28	6	0,25	0,5	0,5
IC90	128	1	4	0,5	0,75	16	512	3	2	0,38	0,5	64	35	22,5	38	40,25	20	43,5	128	1	1	16

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

Tabulka 20. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro *Aspergillus* spp.* (n=28) po 24 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	128,0	0,11	3,12	0,34	0,61	2,00	332,69	0,72	2,04	0,23	0,35	5,23	7,01	15,31	19,20	25,36	11,66	15,69	128,00	0,28	0,95	1,19
SD	0	0,291	2,098	0,125	0,966	7,708	179,980	0,739	3,524	0,121	4,873	21,088	2,081	2,493	5,302	3,465	3,673	10,815	85,973	0,151	6,981	2,253
Min	128	0,031	1	0,25	0,125	0,5	48	0,064	0,38	0,064	0,016	1,5	6	11,5	11	18	6,5	6	32	0,125	0,5	0,5
Max	128	1	8	0,5	4	32	512	3	12	0,5	16	64	14	21	31	32,5	23	45	256	0,5	32	8
IC50	128	0,063	4	0,25	0,5	1	512	0,875	2	0,25	0,19	3,5	6	15,5	19,25	25,5	13	16	128	0,25	0,5	1
IC90	128	0,65	8	0,5	2	16	512	1,5	9,2	0,416	12	64	10,5	19,3	27,6	29,65	15,5	30,8	256	0,5	10,4	5,2

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů * *A. fumigatus* (n=13), *A. flavus* (n=6), *A. niger* (n=7), *A. terreus* (n=2)

Tabulka 21. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro *Candida albicans* (n=17) po 24 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	1,23	0,44	0,10	0,06	0,11	0,08	2,63	0,14	0,04	0,08	0,08	18,21	24,51	20,03	31,84	25,89	17,30	28,25	2,66	0,31	0,50	0,50
SD	40,771	10,209	8,165	0,460	0,142	0,048	119,822	14,987	0,347	0,925	0,129	29,382	6,731	4,199	5,006	8,157	2,373	7,369	64,681	2,512	0,000	0,000
Min	0,125	0,125	0,016	0,031	0,031	0,063	0,38	0,012	0,008	0,023	0,023	1	6	11	17	6	13	13	0,25	0,125	0,5	0,5
Max	128	32	32	2	0,5	0,25	512	64	1,5	4	0,38	64	34	27	40,5	37,5	22	44	256	8	0,5	0,5
IC50	0,5	0,25	0,031	0,031	0,063	0,063	2	0,064	0,023	0,064	0,064	64	27	21	33	29,5	18	29	2	0,125	0,5	0,5
IC90	56	13,4	7	0,25	0,35	0,125	9,6	2,2	0,214	0,35	0,38	64	32,8	25	37,4	35,8	20	38,6	60,8	4,4	0,5	0,5

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

Tabulka 22. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro non-*albicans Candida** (n=44) druhy rezistentní k flukonazolu po 24 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	19,33	0,90	0,48	0,34	0,17	1,00	24,14	0,93	0,26	0,27	0,14	8,70	16,58	13,88	25,38	22,97	14,78	18,57	10,13	0,35	0,58	1,91
SD	39,391	4,652	0,423	0,526	0,327	6,429	102,975	10,482	0,387	1,017	0,285	31,053	5,422	2,706	4,214	5,929	3,463	13,199	14,191	1,193	0,279	6,911
Min	2	0,25	0,031	0,063	0,031	0,063	3	0,064	0,094	0,094	0,003	0,19	6	7	12	6	10,5	6	0,25	0,125	0,5	0,5
Max	128	32	2	2	2	32	512	64	2	6	1	64	32	22,5	32	35,5	25,5	44	64	8	2	32
IC50	16	1	0,5	0,25	0,125	2	24	0,875	0,25	0,25	0,125	64	17	14	26,25	25,25	13,75	24,5	16	0,25	0,5	1,5
IC90	128	1,7	1	1	0,5	13,6	64	3,7	0,5	0,5	0,75	64	24	16,35	30,85	30,4	20	40,4	32	1	1	16

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

* *C. krusei* (n=12), *C. glabrata* (n=12), *C. inconspicua* (n=10), *C. norvegensis* (n=10)

Tabulka 23. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro *non-albicans Candida** (n=43) druhů citlivé k flukonazolu po 24 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	1,16	0,47	0,15	0,07	0,16	0,24	2,33	0,11	0,04	0,06	0,08	4,48	30,34	19,91	35,89	34,71	16,29	24,30	1,10	0,19	0,51	0,97
SD	19,280	6,712	4,817	9,629	0,277	14,189	10,348	0,984	0,078	0,259	0,090	24,830	6,924	3,521	3,919	7,044	2,501	12,775	5,814	1,313	0,075	28,353
Min	0,125	0,125	0,016	0,031	0,031	0,063	0,5	0,016	0,006	0,008	0,023	0,5	6,5	12	26,5	16,5	10	6	0,125	0,125	0,5	0,5
Max	128	32	32	64	1	64	48	4	0,38	1,5	0,38	64	43	31	44	46	21	54	32	8	1	128
IC50	1	0,25	0,125	0,031	0,125	0,063	1,5	0,064	0,032	0,047	0,094	3	33	20	37	37	17	31	1	0,125	0,5	0,5
IC90	8	1	1	0,5	0,5	8	11,2	1,5	0,177	0,354	0,25	64	39	24,8	40	42,9	19	40,8	8	0,9	0,5	13,6

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

* *C. kefyr* (n=9), *C. lusitanae* (n=11), *C. parapsilosis* (n=11), *C. tropicalis* (n=12)

Tabulka 24. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro ostatní kvasinky* (n=24) po 24 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	3,56	0,89	0,45	0,10	0,36	0,35	5,09	0,42	0,15	0,10	0,11	2,22	26,27	15,86	30,02	33,41	15,89	29,55	3,17	0,31	0,67	1,16
SD	3,200	6,232	0,759	0,145	0,410	26,013	10,289	2,979	0,240	0,077	0,157	27,131	5,925	2,773	3,945	5,921	4,041	15,279	1,968	0,430	4,284	14,141
Min	1	0,25	0,125	0,031	0,063	0,063	0,5	0,008	0,012	0,023	0,023	0,125	15	11,5	25	21	9	6	1	0,125	0,5	0,5
Max	16	32	4	0,5	2	128	48	8	1	0,25	0,5	64	38,5	21,5	43	45	23	54	8	2	16	64
IC50	4	1	0,5	0,125	0,5	0,063	6	0,565	0,1575	0,1095	0,1095	1	27	16,5	30	35,25	17	40,5	4	0,25	0,5	0,5
IC90	8	1,7	1	0,425	1	16	16	8	0,5	0,25	0,38	64	35,7	19,7	34,7	40,55	21,85	48,7	6,8	1	0,5	16

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů * *Saccharomyces cerevisiae* (n=10), *Blastoschizomyces capitatus* (n=7), *Trichosporon* spp. (n=7)

Tabulka 25. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro celý soubor (n=156) houbových kmenů po 48 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						Fungitest (µg/ml)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	MKZ	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	13,3	0,7	0,7	0,3	0,5	1,5	21,3	0,7	0,3	0,2	0,3	16,9	18,4	16,1	27,4	25,7	14,2	19,0	17,51	1,3	0,9	2,3	2,0	4,7	16,0	0,7	0,8	2,3
SD	57,27	8,02	6,61	10,15	0,87	47,92	207,73	8,03	11,50	5,19	9,60	29,62	11,29	4,78	8,20	9,25	3,81	12,86	21,961	0,90	1,09	1,69	0	9,26	101,78	2,77	7,00	37,08
Min	0,25	0,063	0,016	0,031	0,063	0,063	0,5	0,016	0,008	0,012	0,023	0,19	6	6,5	8,5	6	6,5	6	8	0,5	0,5	0,5	2	2	0,25	0,125	0,5	0,5
Max	128	32	32	64	8	128	512	64	64	64	64	64	45	37	46	47	25	60	64	4	4	8	2	32	256	8	32	128
IC50	16	0,75	1	0,25	0,5	1	16	0,75	0,25	0,25	0,25	64	22,25	16	28,25	26	15	25	24	2	0,5	4	2	2	16	0,5	0,5	0,5
IC90	128	2	6	2	2	128	512	6	3,5	0,875	1	64	37	23	40	40	19	40	64	2	2	4	2	16	256	8	1	64

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

Tabulka 26. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro *Aspergillus* spp.* (n=28) po 48 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						Fungitest (µg/ml)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	MKZ	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	128,0	0,2	4,5	0,4	1,2	67,2	512,0	2,1	5,9	0,4	2,2	41,2	6,5	14,3	18,1	21,2	9,8	13,5	59,67	1,2	2,6	3,7	2,0	19,5	210,0	0,8	1,6	26,9
SD	0	0,61	7,43	0,19	0,84	50,78	0	2,33	23,20	0,30	20,26	21,38	1,61	2,94	7,00	4,52	2,46	12,67	10,302	0,99	1,07	0,65	0	7,23	60,43	1,39	12,88	54,29
Min	128	0,063	2	0,25	0,5	4	512	0,094	1	0,125	0,094	2	6	9	8,5	14,5	6,5	6	24	0,5	0,5	0,5	2	16	64	0,25	0,5	1
Max	128	2	32	1	4	128	512	8	64	1,5	64	64	12	20	33	32	18,5	60	64	4	4	4	2	32	256	8	32	128
IC50	128	0,125	4	0,5	1	128	512	3	4	0,44	1	64	6	14	17,5	21,25	10,25	17	64	2	2	4	2	16	256	0,75	0,5	64
IC90	128	1,3	8	0,5	2	128	512	6,6	64	0,825	41,6	64	9,65	19,15	27	27,3	12	30,8	64	2	4	4	2	32	256	1	32	128

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

* *A. fumigatus* (n=13), *A. flavus* (n=6), *A. niger* (n=7), *A. terreus* (n=2)

Tabulka 27. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro *Candida albicans* (n=17) po 48 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						Fungitest (µg/ml)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	MKZ	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	1,4	0,7	0,1	0,1	0,4	0,1	3,0	0,2	0,0	0,1	0,1	38,8	29,2	21,3	35,3	23,5	16,5	21,8	10,90	0,9	0,7	1,3	2,0	2,0	30,7	2,1	0,6	0,5
SD	40,71	12,06	10,26	0,46	0,26	0,10	119,72	14,98	0,35	0,92	0,12	22,39	10,07	5,54	5,20	7,45	2,39	8,59	18,092	1,18	0,92	1,75	0	0	125,11	3,65	0,21	0,12
Min	0,25	0,125	0,016	0,031	0,063	0,063	0,5	0,016	0,008	0,023	0,047	1,5	6	10	21	6	11,5	6	8	0,5	0,5	0,5	2	2	0,5	0,125	0,5	0,5
Max	128	32	32	2	1	0,5	512	64	1,5	4	0,38	64	45	30	41	35	19	38	64	4	4	4	2	2	256	8	1	1
IC50	0,5	0,25	0,031	0,031	0,5	0,125	2	0,094	0,032	0,064	0,094	64	32	23	37	26	17,5	25	8	0,5	0,5	0,5	2	2	256	8	0,5	0,5
IC90	60,8	32	13,4	0,25	1	0,25	12	2,2	0,266	0,35	0,38	64	43,4	28,4	40	34,1	19	33,8	40	2,8	2	4	2	2	256	8	1	0,5

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

Tabulka 28. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro non-*albicans Candida** (n=44) druhy rezistentní k flukonazolu po 48 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						Fungitest (µg/ml)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	MKZ	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	52,1	1,2	0,9	0,8	0,4	2,0	51,8	1,5	0,4	0,5	0,3	14,7	15,5	13,7	24,3	20,0	14,7	17,2	24,76	1,8	1,0	3,1	2,0	5,1	21,2	0,8	0,6	2,3
SD	51,66	7,81	0,98	0,76	0,51	7,69	161,04	10,83	0,56	1,81	0,39	30,27	5,42	3,38	4,49	5,20	3,86	11,87	16,217	0,79	0,85	1,37	0	6,97	23,30	1,98	0,36	8,94
Min	8	0,25	0,125	0,125	0,063	0,063	3	0,25	0,125	0,125	0,023	0,5	6	6,5	12	6	10	6	8	0,5	0,5	0,5	2	2	2	0,25	0,5	0,5
Max	128	32	4	4	2	32	512	64	3	12	1,5	64	30,5	30	36	32,5	25	44	64	4	4	8	2	16	128	8	2	32
IC50	64	1	1	1	0,375	4	64	1	0,38	0,5	0,315	64	15,5	14	24	21	14,25	24,5	24	2	0,5	4	2	2	32	0,5	0,5	2
IC90	128	2	2	2	1	16	512	5,4	1	1	1	64	23,85	16	29,7	26,7	20,7	36	64	2	2	4	2	16	64	3,4	1	16

FLZ – flukonazol, **ITR** – itrakonazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

* *C. krusei* (n=12), *C. glabrata* (n=12), *C. inconspicua* (n=10), *C. norvegensis* (n=10)

Tabulka 29. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro non-*albicans Candida** (n=43) druhů citlivé k flukonazolu po 48 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						Fungitest (µg/ml)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	MKZ	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	2,5	0,7	0,3	0,2	0,4	0,5	3,8	0,2	0,1	0,1	0,2	14,7	29,7	19,2	35,5	33,4	15,6	20,6	9,09	0,9	0,6	1,9	2,0	2,6	3,6	0,5	0,6	1,1
SD	36,58	9,14	8,08	19,14	0,39	44,13	22,58	2,26	0,32	9,62	0,12	29,97	7,43	3,98	5,17	8,56	2,24	11,14	5,129	0,74	0,48	2,01	0	5,93	82,83	3,40	0,31	30,59
Min	0,25	0,125	0,016	0,031	0,125	0,063	0,75	0,016	0,016	0,012	0,064	0,5	6,5	12	23	13	9,5	6	8	0,5	0,5	0,5	2	2	0,25	0,125	0,5	0,5
Max	128	32	32	64	2	128	128	12	2	64	0,5	64	43	37	46	47	20	47	24	2	2	8	2	32	256	8	2	128
IC50	2	0,5	0,125	0,063	0,5	0,25	2	0,19	0,047	0,064	0,19	64	33	19,5	37	38	16	25	8	0,5	0,5	4	2	2	2	0,125	0,5	0,5
IC90	28,8	3,4	4	8,2	1	128	22,4	2,8	0,238	1,3	0,38	64	39,8	23,4	40,4	43,8	18	39,2	20,8	2	1,7	4	2	13,2	230,4	8	1	57,6

FLZ – flukonazol, **ITR** – itraconazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů

* *C. kefyr* (n=9), *C. lusitanae* (n=11), *C. parapsilosis* (n=11), *C. tropicalis* (n=12)

Tabulka 30. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro ostatní kvasinky* (n=24) po 48 h

	Mikrodiluce (µg/ml)						E-test (µg/ml)						Disk test (mm)						Fungitest (µg/ml)						ATB Fungus (µg/ml)			
	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	VOR	AmB	5FC	FLZ	ITR	KET	MKZ	AmB	5FC	FLZ	ITR	AmB	5FC
GM	7,3	1,1	0,6	0,2	0,8	0,4	8,9	1,2	0,3	0,1	0,2	5,5	25,3	15,0	29,3	33,8	15,7	26,7	10,06	1,7	0,7	1,7	2,0	4,0	4,4	0,6	0,9	1,6
SD	5,80	6,21	1,50	0,40	1,55	26,02	100,48	4,19	0,35	0,14	0,33	30,15	6,61	3,44	4,43	6,68	3,85	14,89	6,498	0,50	0,68	1,73	0,00	10,40	2,99	0,48	8,66	21,25
Min	2	0,25	0,125	0,031	0,063	0,063	0,5	0,023	0,032	0,023	0,064	0,19	12,5	10,5	22	20,5	9	6	8	0,5	0,5	0,5	2	2	1	0,125	0,5	0,5
Max	16	32	8	2	8	128	512	12	1,5	0,5	1,5	64	37	26	42	46	22	49	24	2	2	4	2	32	16	2	32	64
IC50	8	1	0,5	0,125	1	0,125	12	1,5	0,44	0,19	0,19	3	25,5	15,25	28,5	35	17,25	39	8	2	0,5	4	2	2	4	0,5	0,5	0,5
IC90	16	1,7	1	0,5	2	16	24	12	0,925	0,38	0,75	64	34,85	19,4	34,35	43,45	20	46	24	2	2	4	2	27,2	8	1	1	54,4

FLZ – flukonazol, **ITR** – itraconazol, **KET** – ketokonazol, **VOR** – vorikonazol, **AmB** – amfotericin B, **5FC** – flucytosin

GM – geometrický průměr, **SD** – směrodatná odchylka, **Min/ Max** – minimální/ maximální hodnota MIC/ inhibiční zóny, **IC50/ IC90** – max hodnota MIC/ minimální hodnota inhibiční zóny pro 50%/ 90% testovaných kmenů * *Saccharomyces cerevisiae* (n=10), *Blastoschizomyces capitatus* (n=7), *Trichosporon* spp. (n=7)

Pro zjištění lineární závislosti hodnot naměřených jednotlivými metodami byly stanoveny Spearmanovy korelační koeficienty. Metody byly porovnávány jak vzájemně mezi sebou po 24 h resp. po 48 h tak „křížem“ 24 h vs. 48 h.

Srovnání výsledků jednotlivých metod po 24 h a 48 h u celého souboru testovaných kvasinek a plísní ukázalo významnou lineární souvislost všech metod zejména u flukonazolu a vorikonazolu (Tab. 31). Vysoké korelační koeficienty byly zjištěny při porovnání stejné metody po 24 h a 48 h především u mikrodiluční bujónové metody, E-testu a diskového testu (kolem hodnoty 0,9). U komerčních stripů (Fungitest, ATB fungus) byly korelace pro některá antimykotika i skupiny hub nižší. Velmi dobrých korelací bylo dosaženo srovnáním diskového difúzního testu po 24 h a E-testu po 48h (inverzní závislost) u všech antimykotik kromě flucytosinu a u všech podskupin testovaných hub kromě aspergilů a non-*albicans* kandid se sníženou citlivostí k flukonazolu. Korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro definované skupiny hub shrnují Tabulky 41 až 45 v Příloze.

Při porovnání jednotlivých metod pro celý soubor testovaných kvasinek a plísní po 24 h (Tab. 32) byly nejlepší korelace zjištěny pro flukonazol a to pro všechny kombinace metod. U ostatních antimykotik vykazovalo nejlepší lineární souvislost srovnání E-testu a diskového difúzního testu s výjimkou flucytosinu, u kterého byla nejlepší souvislost mezi ATB fungus testem a mikrodilucí a ATB fungus testem a E-testem.

Výsledky porovnání jednotlivých metod pro celý soubor testovaných kvasinek a plísní po 48 h (Tab. 33) byly podobné jako po 24 h - nejlepší korelace byly zjištěny pro flukonazol. U ostatních antimykotik vykazovalo nejlepší lineární souvislost srovnání E-testu a diskového difúzního testu s výjimkou flucytosinu, u kterého byla nejlepší souvislost u dilučních metod (mezi ATB fungus testem a mikrodilucí a ATB fungus testem a Fungitestem).

Tabulka 31. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro všechny testované kmeny (n = 156)

Flukonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,9224	0,8779	-0,8874	0,8576	0,6429
E-test 24h	0,8037	0,9574	-0,9054	0,7992	0,6519
Disk test 24h	-0,7871	-0,8755	0,9527	-0,8134	-0,7032
ATB fungus 24h	0,8181	0,8382	-0,8556	0,8232	0,7663

Itrakonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8827	0,3795	-0,3303	0,5000	0,3187
E-test 24h	0,3631	0,8657	-0,6807	0,4477	0,4313
Disk test 24h	-0,3568	-0,7160	0,9347	-0,5026	-0,4066
ATB fungus 24h	0,3232	0,5814	-0,5876	0,4765	0,5813

Ketokonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h
Mikrodiluce 24h	0,8921	0,7062	-0,6787	0,7098
E-test 24h	0,5847	0,9396	-0,7983	0,6357
Disk test 24h	-0,6132	-0,8048	0,9076	-0,6581

Vorikonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h
Mikrodiluce 24h	0,8731	0,7101	-0,5996
E-test 24h	0,7331	0,8904	-0,7144
Disk test 24h	-0,5120	-0,7670	0,9391

Amfotericin B	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8591	0,5043	-0,3709	0,0000	0,1948
E-test 24h	0,2805	0,8643	-0,6568	0,0000	0,4728
Disk test 24h	-0,1640	-0,6755	0,9073	0,0000	-0,3773
ATB fungus 24h	0,2139	0,4244	-0,2848	0,0000	0,5827

Flucytosin	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8727	0,4350	-0,6703	0,7731	0,8727
E-test 24h	0,4852	0,7758	-0,4805	0,4129	0,4745
Disk test 24h	-0,7345	-0,4378	0,9238	-0,6115	-0,6883
ATB fungus 24h	0,7203	0,4367	-0,5825	0,7215	0,8106

Tabulka 32. Spearmanovy korelační koeficienty pro 24 h pro všechny testované kmeny (n = 156)

Flukonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test	ATB fungus
Mikrodiluce		0,8775	-0,8753	0,8872
E-test			-0,8894	0,8611
Disk test				-0,8679
ATB fungus				

Itrakonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test	ATB fungus
Mikrodiluce		0,4233	-0,3696	0,3358
E-test			-0,7192	0,6696
Disk test				-0,6214
ATB fungus				

Ketokonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test
Mikrodiluce		0,6628	-0,6912
E-test			-0,8123
Disk test			

Vorikonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test
Mikrodiluce		0,7265	-0,5731
E-test			-0,7211
Disk test			

Amfotericin B	Mikrodiluce	E-test	Disk test	ATB fungus
Mikrodiluce		0,3910	-0,3116	0,2070
E-test			-0,6603	0,4098
Disk test				-0,3354
ATB fungus				

Flucytosin	Mikrodiluce	E-test	Disk test	ATB fungus
Mikrodiluce		0,5364	-0,2831	0,8214
E-test			0,0819	0,8214
Disk test				-0,2223
ATB fungus				

Tabulka 33. Spearmanovy korelační koeficienty pro 48 h pro všechny testované kmeny (n = 156)

Flukonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test	Fungitest	ATB fungus
Mikrodiluce		0,8135	-0,8203	0,8196	0,6048
E-test			-0,9120	0,8126	0,6269
Disk test				-0,8070	-0,6254
Fungitest					0,6601
ATB fungus					

Itrakonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test	Fungitest	ATB fungus
Mikrodiluce		0,3699	-0,3529	0,5224	0,3490
E-test			-0,7400	0,4473	0,3847
Disk test				-0,5612	-0,3843
Fungitest					0,4557
ATB fungus					

Ketokonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test	Fungitest
Mikrodiluce		0,6321	-0,6058	0,6643
E-test			-0,8075	0,6576
Disk test				-0,5941
Fungitest				

Vorikonazol	Mikrodiluce	E-test	Disk test
Mikrodiluce		0,7178	-0,5567
E-test			-0,7834
Disk test			

Amfotericin B	Mikrodiluce	E-test	Disk test	Fungitest	ATB fungus
Mikrodiluce		0,4052	-0,2436	0,0000	0,2172
E-test			-0,7425	0,0000	0,4577
Disk test				0,0000	-0,3338
Fungitest					0,0000
ATB fungus					

Flucytosin	Mikrodiluce	E-test	Disk test	Fungitest	ATB fungus
Mikrodiluce		0,5019	-0,6542	0,8031	0,9108
E-test			-0,4262	0,4467	0,4949
Disk test				-0,5625	-0,6091
Fungitest					0,8584
ATB fungus					

Další částí studie bylo porovnávání jednotlivých metod stanovení antifungální citlivosti v rámci kategorií citlivý, citlivý v závislosti na dávce (SDD) nebo rezistentní vůči standardní metodice (mikrodiluční bujónové metodě, M27-A2). Po srovnání metod po 24 h pro celý soubor testovaných hub (Tab. 34) byla nejlepší celková shoda zaznamenána u vorikonazolu, amfotericinu B a flukonazolu, s čímž souvisí i velmi nízké procento výskytu falešných rezistencí i citlivostí. Nejvyšší procento velké neshody (falešná rezistence) bylo nalezeno při srovnání E-testu a mikrodiluce u flucytosinu. Podobných výsledků bylo dosaženo i při srovnání testovaných metod s mikrodilucí po 48 h pro celý soubor testovaných hub (Tab. 35), ačkoliv procento celkové shody je téměř u všech metod nižší. Výsledky pro definované skupiny hub jsou uvedeny v Příloze - Tabulky 36 až 40.

Tabulka 34. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 24 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u všech testovaných kmenů (n = 156).

Antimykotikum	Metoda	MN (%)	VN (%)	VVN (%)	Celková shoda (%)
Flukonazol	E-test	19,9	0,6	0,6	78,9
	Disk test	15,4	0	0,6	84,0
	ATB fungus	13,5	0,6	0,6	85,3
Itrakonazol	E-test	42,9	7,1	5,8	44,2
	Disk test	52,6	1,3	23,7	22,4
	ATB fungus	53,8	0	10,9	35,3
Ketokonazol	E-test	25,7	0	3,8	70,5
	Disk test	26,9	0	5,8	67,3
Vorikonazol	E-test	4,8	0	0,6	94,6
	Disk test	5,8	0,6	0	93,6
Amfotericin B	E-test	11,5	1,3	1,3	85,9
	Disk test	7,1	1,3	1,3	90,3
	ATB fungus	11,4	2,6	1,3	84,7
Flucytosin	E-test	20,6	17,9	0	61,5
	Disk test	20,4	9,0	0	70,6
	ATB fungus	10,2	0	1,3	88,5

MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 35. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u všech testovaných kmenů (n = 156).

Antimykotikum	Metoda	MN (%)	VN (%)	VVN (%)	Celková shoda (%)
Flukonazol	E-test	21,9	0,6	3,2	74,3
	Disk test	22,4	0	4,5	73,1
	Fungitest	22,4	0	1,9	75,7
	ATB fungus	24,4	7,7	1,3	66,6
Itrakonazol	E-test	37,2	6,4	4,5	51,9
	Disk test	47,4	1,9	29,5	21,2
	Fungitest	66,7	0	5,8	27,5
	ATB fungus	53,2	5,1	1,3	40,4
Ketokonazol	E-test	30,8	0	6,4	62,8
	Disk test	32,7	0	11,5	55,8
	Fungitest	22,4	0	4,5	73,1
Vorikonazol	E-test	10,9	0	1,9	87,2
	Disk test	14,1	0	1,9	84,0
Amfotericin B	E-test	32,1	0	6,4	61,5
	Disk test	31,4	0	9,0	59,6
	Fungitest	33,3	0	12,2	54,5
	ATB fungus	40,4	1,3	4,5	53,8
Flucytosin	E-test	23,2	29,9	0	49,9
	Disk test	23,8	6,4	5,1	64,7
	Fungitest	16,0	0	1,9	82,1
	ATB fungus	14,7	0	1,3	84,0

MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

6 DISKUZE

Rychlé testy dnes zaujímají významné místo v laboratorní diagnostice kvasinkových infekcí, zejména vzhledem k časovému a finančnímu hledisku (Pfaller et al. 1996, Campbell et al. 1998, Hoppe et al. 1999, Foongladda et al. 2002). Poskytují rychlé a účelné zhodnocení nálezů, při zachování relativní spolehlivosti výsledků s ohledem na hlavní zástupce kvasinkových mikroorganismů. Zároveň umožňují podstatnou úsporu nákladů na zpracování klinických vzorků snížením počtu vzorků určených pro druhovou identifikaci pomocí časově náročnějších a nákladnějších diagnostických testů. Rychlá, prozatímní identifikace je především zaměřena na *C. albicans*, která zůstává nejčastěji izolovanou kvasinkou z klinických materiálů s podílem 60 až 80% všech izolátů v mikrobiologické laboratoři. Klasickým testem rychlé identifikace *C. albicans* je test tvorby klíčnicích hyf v séru - tzv. germinační test (Sudbery et al. 2004), jehož výsledek je k dispozici již po 2,5 až 4 hodinách. Tato metoda bývá doplněna o nenáročné fyziologické testy založené na pozorování druhově charakteristické morfologie na speciálních půdách (např. rýžový nebo kukuřičný agar). Na rozdíl od germinačního testu tyto testy mají spíše hodnotu pomocného kritéria (např. chlamydo-spory, které lze pozorovat na těchto agarech, tvoří v průměru jen 2/3 kmenů *C. albicans*), navíc výsledky jsou k dispozici nejdříve po 24 h, ale obvykle až po 48 až 72 h.

Výsledky naší studie potvrdily vysokou spolehlivost testu klíčnicích hyf u *C. albicans* ve smyslu jeho specifity a senzitivity, která se pohybovala kolem 99% (Tab. 10). Z dlouhodobého hlediska při vyšších počtech testovaných kmenů se můžeme vzácně, ale pravidelně, setkat s kmeny, které klíční hyfy netvoří (Campbell et al. 1998, Foongladda et al. 2002, Cárdenes et al. 2002). Obvykle se jedná o falešně negativní výsledek, který má několik příčin. Jednou z nich může být použití séra z pacientů nebo zvířat, kteří přišli do bližšího kontaktu s kvasinkami a vytvořili si specifické protilátky, které inhibují konverzi z blastospóry do vláknité formy. To lze do značné míry eliminovat přechodem na telecí nebo kolostrální sérum. Dnes přichází v úvahu jako příčina předchozí nebo současná terapie antimykotiky. Podceňovat nelze ani technické nedostatky v provedení metody, zvláště příliš veliké inokulum ($>10^6$ CFU/ml), u kterého se negativně projevuje vliv tvorby quorum sensing (Hornby et al. 2001). Méně častý problém představují falešně pozitivní výsledky, které tak snižují specifitu testu (Foongladda

et al. 2002, Cárdenes 2002). V našem souboru dva kmeny *C. tropicalis* tvořily klíční hyfy v séru. Schopnost vytvářet klíční hyfy se týká i jiných non-*albicans* druhů (např. *C. parapsilosis*), zejména pokud není dodržen časový interval vymezený pro hodnocení testu. Z praktického hlediska hodnocení germinačního testu je největší komplikací tvorba pseudohyf, která se vyskytuje u velké části non-*albicans* druhů a které mohou být pro nezkušené oko při použití nižšího rozlišení často k nerozeznání od pravých hyf. To podpořily i výsledky testování růstu non-*albicans* *Candida* druhů v séru a NYP médiu, zvláště i *C. tropicalis*, *C. krusei* a *C. lusitaniae* (Graf 2). Tyto pokusy zároveň potvrdily známou skutečnost, že humanní izoláty *C. glabrata* a pивní kvasinky *S. cerevisiae* netvoří mycelium nebo pseudomycelium. Třetím druhem, který tak nečinil u našeho souboru by *C. guilliermondii*, o níž je známo, že má rovněž malý potenciál k filamentaci – na rýžovém agaru tvoří některé kmeny obvykle jen retardované mycelium.

Chromogenní média jsou obecně určena k prozatímní identifikaci daného mikroba na základě zbarvení kolonie vyrostlé na agaru. Tímto způsobem můžeme získat pohotové informace o potenciálním patogenu již v primokultivaci, tj. v převážné většině případů do 24 h od vyočkování materiálu a to i ve směsné kultuře (Pfaller et al. 1996). V případě použití chromogenních agarů za účelem primoizolace jde však o způsob relativně nákladný, který obvykle vyžaduje předběžnou selekci klinického materiálu podle důležitosti a nepředpokládá již další dourčování pomocí jiných testů. V naší studii jsme se zaměřili na využití chromogenních půd k identifikaci již získaných primoizolátů kvasinek, což nám umožnilo testovat na jedné plotně až 16 izolátů. Na obou testovaných půdách byly spolehlivě identifikovány kmeny *C. albicans* (specifická 99,84 - 100%), v případě HiCrome Candida Agarů také *C. tropicalis* (specifická 99,84 - 100%) (Tab. 10 a 12). Ačkoliv výrobce HiCrome Candida Agarů udává možnost identifikace kvasinky *C. glabrata*, která by měla růst jako světle růžová kolonie, barva jejích kolonií však byla nerozeznatelná od ostatních kvasinek, a tedy prakticky nebylo možné tento druh identifikovat. Ukázalo se, že růžový odstín kolonie je u *C. glabrata* závislý na hustotě nárůstu, tj. zřetelně patrný pouze v případě izolativního rozočkování, kdy lze pozorovat samostatné kolonie, což není případ inokulačních čar u námi modifikovaného designu testu. Záleží tedy i na finančních možnostech zdravotnického zařízení a na nákladové efektivitě identifikace kvasinek v dané laboratoři.

Laboratorní testování citlivosti původců mykóz k antimykotikům se v současnosti stává nezbytností zejména u imunoalterovaných pacientů. Zvyšující se výskyt rezistentních kmenů a druhů hub a rozšiřující se možnosti terapie invazivních mykóz v posledním desetiletí vedou lékaře stále častěji k úvahám o výběru látky optimální terapie s maximálním účinkem proti původci infekce. Zároveň jsou od 90. let minulého století k dispozici standardizované testy, i když stále jejich využití k výběru adekvátní antimykotické terapie na základě stanovených interpretačních kritérií (angl. break-points) je omezené na flukonazol, itraconazol, flucytosin a nejnověji na vorikonazol (Buchta 2002). Metody testování antifungálních látek *in vitro* lze využít také při stanovení hladin antimykotik v tělních tekutinách. Získané výsledky testování však obvykle vedou jen k relativním, nikoliv absolutním závěrům o klinické použitelnosti daného preparátu. Potřebnější a perspektivnější je stanovení hladiny v tělních tekutinách u antimykotik s variabilní farmakokinetikou jako jsou triazolové preparáty vorikonazol nebo itraconazol, které umožní nastavení individuálního a adekvátního dávkování.

I přes značný pokrok na poli testování antifungální citlivosti, zůstává celá řada nevyřešených problémů, včetně absence standardizovaných testů pro všechna antimykotika. Např. dodnes není k dispozici spolehlivý test a interpretační kritéria pro amfotericin B a jeho lipidové formulace. Stávající testy se potýkají s deficitem detekce rezistence u tohoto polyenu (Buchta 2002). V našich pokusech jsme interpretaci výsledků řešili na základě vlastních kritérií, která vycházela z několika publikovaných studií *in vitro*, které zahrnovaly rovněž srovnání s terapeutickým efektem (Lozano Chiu et al. 1997, Peyron et al. 2001, Nguyen et al. 1998, Clancy a Nguyen 1999). V případě diskového testu byla interpretační kritéria pro všechna antimykotika, vyjma flukonazolu vorikonazolu, stanovena na základě dlouhodobých zkušeností s testováním ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové a doporučení některých výrobců antimykotických disků (viz Tab.7).

Při laboratorním testování citlivosti antimykotik *in vitro* mohou být výsledky ovlivněny mnoha faktory, např. velikostí inokula (se vzrůstající velikostí inokula roste hodnota MIC), pH (např. ve výrazně kyselém prostředí dochází ke ztrátě aktivity azolových antimykotik), prodlužování doby inkubace snižuje citlivost kmenů k většině antimykotik (Otčenášek et al., 1990, Buchta 2002).

V první fázi experimentů *in vitro*, jsme se zaměřili na standardizaci metodiky testování citlivosti k vorikonazolu s ohledem na již standardizované metodiky

používané u flukonazolu. Vorikonazol patří do druhé generace triazolových derivátů s velmi širokým spektrem účinku, který je dostupný v perorální i intravenózní formě a je primárně určený k léčbě invazivních houbových infekcí, zvláště aspergilózy (Herbrecht et al. 2002, Jeu et al. 2003, Walsh et al. 2002, Sambatakou et al. 2006). V poslední době se úsilí klinických a laboratorních mykologů soustředilo na stanovení break-pointů vorikonazolu, které by zpřesnilo možnosti jeho výběru a zefektivnilo tak v konečném důsledku terapii. Pro kvasinky rodu *Candida* byly navrženy break-pointy pro MIC v kategorii citlivý ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, na dávce závislá citlivost (SDD) 2 $\mu\text{g/ml}$ a rezistentní ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ a tomu odpovídající hodnoty velikosti inhibiční zóny u diskového testu: ≥ 17 mm pro citlivý kmen, 14 až 16 mm pro kmen s SDD a pro rezistentní kmeny ≤ 13 mm (Pfaller et al. 2006). Porovnání výsledků standardů CLSI M27 a M38-A s E-testem (Biodisk, Solna, Sweden) v předchozích studiích ukázalo vysoký stupeň shody výsledků dosažených oběma metodikami, a tedy E-test jako jejich plnohodnotnou alternativu (Matar et al. 2003, Morace a Polonelli 2005, Serrano et al. 2004).

Výsledky pokusů potvrdily, že flukonazol a vorikonazol lze rutinně testovat nejenom standardní metodikou (M27-A), ale také alternativními testy, které lze snadno použít i v laboratoři – zejména E-test a diskový test. Vorikonazol vykazoval typické *in vitro* spektrem aktivity, které zahrnuje aspergily a vzácnější rody vláknitých hub (*Fusarium*, *Scedosporium*) a kvasinky, včetně druhů s primárně sníženou nebo variabilní citlivostí k flukonazolu (*Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Jeu et al. 2003, Johnson a Kauffman 2003, Perfect et al. 2003). Porovnání diskového testu a E-testu ukázalo u našeho souboru kvasinek a vláknitých plísní, pokud jde o jednotlivé kategorie, velmi dobrou celkovou shodu v citlivosti většiny kmenů testovaných hub k flukonazolu i vorikonazolu, která nebyla významně ovlivněna délkou inkubace (Tab. 13 a 14). V souladu s předchozími studiemi, stupeň shody byl nejvyšší u druhů univerzálně citlivých (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*) resp. rezistentních (*Aspergillus* spp., *C. krusei*, *C. norvegensis*) k flukonazolu, problematičtější bylo srovnání u druhů s variabilní citlivostí k flukonazolu zvláště u kmenů *C. glabrata*, částečně i *C. tropicalis*. Celkově nejvyššího stupně shody výsledků – 90,5% a 89,2% - bylo dosaženo na MH agaru u E-testu po 48 h a diskového testu po 24 h a 48 h.

Do studie bylo zařazeno několik kmenů kandid se sekundárně sníženou citlivostí k flukonazolu (kategorie SDD nebo R). Tyto kmeny byly k vorikonazolu převážně citlivé nebo SDD (obvykle až po 48 h), což naznačuje jak rozdíly ve spektru *in vitro* a farmakodynamice (razantnější účinek), tak podobnost mechanismů tolerance u triazolových antimykotik. Je pravděpodobné, s ohledem na stále širší používání vorikonazolu, zvyšující se reálné riziko vzniku zkřížené rezistence v budoucnosti. Relativně největší podíl kmenů se sníženou citlivostí k vorikonazolu měla *C. glabrata*, u které byly hodnoty MIC silně ovlivněny délkou inkubace a díky této variabilitě citlivosti a vlivům řady faktorů odpovídaly za většinu malých a velkých neshod. Bližší analýza ukázala, že obě metody (jak E-test tak diskový difúzní test) nejsou schopny po 24 h zachytit většinu SDD resp. rezistentních kmenů *C. glabrata*, u našeho souboru prakticky obě metody detekovaly jeden rezistentní kmen, disková navíc jeden kmen SDD, ostatní kmeny (>90%) sejevily oběma metodami jako citlivé. Po 48 h však počet SDD kmenů *C. glabrata* vzrostl u E-testu i diskové metody na 5 resp. 7. I přes malý počet testovaných kmenů (n=12), nelze přehlédnout tendenci obou metod k falešné citlivosti u kmenů *C. glabrata*, zejména při odečtu po 24 h. Přinejmenším lze z toho usuzovat na značný potenciál části kmenů *C. glabrata* se rychle adaptovat k růstu v přítomnosti azolových antimykotik a na zvýšené riziko vývoje rezistence k novým triazolům ať už dílem jejich širšího používání v budoucnosti nebo implicitně sníženou citlivostí k většině triazolových antimykotik, zvláště flukonazolu (Pfaller et al. 2003, Burn et al. 2004). Odpovídají tomu relativně vyšší absolutní hodnoty MIC a menší velikosti inhibičních zón, které se u kmenů *C. glabrata* v kategorii citlivý blíží hodnotám pro hranici kategorie SDD, zvláště u flukonazolu, méně výrazně u vorikonazolu (Pfaller et al. 2003, Swine et al. 2004). Variabilní citlivost kmenů *C. glabrata* v rozmezí citlivý – citlivý v závislosti dávce se mohla projevit na relativně nízkém korelačním koeficientu v případě porovnání párových hodnot u obou testů pro daný kmen ($r = 0,85$). Avšak pokud byly zprůměrovány hodnoty inhibiční zóny u všech kmenů, nejen *C. glabrata*, které odpovídaly dané hodnotě MIC u E-testu, korelace byla podstatně vyšší ($r = 0,98$).

Změna kultivačního média, použití AST agaru (HiMedia), neměla dramatický vliv na shodu výsledků u obou metod, pokud byly inhibiční zóny u diskového testu měřeny po 24 h (celková shoda 89,9%), opět však s velmi nízkou shodou u *C. glabrata* (41,7%). Naproti tomu po 48 h již významně poklesla

(79,9%) a to zejména díky, vedle *C. glabrata* (50,0%), velmi nízkým hodnotám shody u aspergilů - *Aspergillus niger* (42,9%) a *A. flavus* (33,3%). Přitom u všech testovaných kmenů aspergilů byla při odečtu diskového testu po 24 h shoda 100%. Analýza příčin nápadné diskrepance výsledků u aspergilů na AST agaru ukázala, že se jednalo u většiny kmenů o změny z kategorie citlivý do rezistentní, změny které nebyly na MH agaru pozorovány. Porovnáme-li E-test (po 48 h) a diskový test (po 24 h) na MH agaru a AST agaru ve smyslu interpretace jejich výsledků, byly rozdíly malé ($SDD \pm S / R$) na obou médiích u 8,8% kmenů, s jedinou výjimkou velmi velké neshody u jednoho kmene *C. tropicalis*.

V případě flukonazolu byl stupeň shody výsledků E-testu a diskové metody oproti vorikonazolu nižší v průměru o 15% vzhledem k nízké shodě výsledků a k rezistenci nebo snížené citlivosti kmenů *Aspergillus* spp. a non-*albicans* *Candida* druhů, zvláště *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, částečně u *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*. Celková shoda výsledků obou agarových difúzních metod nebyla podstatně ovlivněna časem odečtu (24 h vs. 48 h) průměru inihibiční zóny (Tab. 13 a 14.). Regresní analýza ukázala podobný korelační koeficient ($r = 0,863$) pro párové hodnoty jako u vorikonazolu a stejně jako pro průměry hodnot diskového testu u kmenů se stejnou hodnotou MIC u E-testu ($r = 0,95$).

Celkově bylo dosaženo u flukonazolu vyšší hodnoty predikce výsledků mezi diskovým testem a E-testem u kategorie rezistentní (88,7% po 24 h vs. 81,0% po 48 h), zatímco u vorikonazolu u kategorie citlivý (91,5% po 24 h vs. 93,9 po 48 h). Jednou z příčin může být všeobecně vyšší antifungální účinek vorikonazolu na kvasinky (a zvláště aspergily), včetně non-*albicans* druhů, které mají často k flukonazolu sníženou citlivost. Vorikonazol tak vykazuje razantnější účinek, a tedy z hlediska odečtu spolehlivější výsledek, tam kde je účinek flukonazolu slabší anebo variabilní. Výjimkou je neúčinnost flukonazolu na aspergily, což je zřejmě v pozadí velmi dobré predikce v kategorii rezistentní.

Z hlediska praxe rozdíly ve výsledcích diskového testu na AST médiu nejsou dramatické vzhledem k tomu, že se jedná o test, který slouží k prozatímnímu stanovení citlivosti, kterou je nutné v případě potřeby potvrdit kvantitativní metodou, tj. stanovením MIC. Výhoda AST agaru spočívala v možnosti rychlejšího odečtu – výsledky jsou k dispozici po 24 h, zatímco použití MH agaru posouvalo hodnocení u diskového testu stejně jako E-testu o dalších 24 h. Na druhé straně zůstává otázkou, zda výsledky diskového testu na AST agaru

lépe vystihují sníženou citlivost resp. rezistenci k vorikonazolu u kmenů *non-fumigatus* aspergilů a *non-albicans* kandid. To by mohlo nepříznivě ovlivnit rozhodování o volbě primární terapie přinejmenším do doby, než budou k dispozici relevantní výsledky dosažené některou ze standardních kvantitativních metod.

Vyhodnocení možnosti využít flukonazol jako tzv. surrogate faktor předjímající *in vitro* citlivost resp. rezistenci k vorikonazolu ukázalo velmi dobrou predikční hodnotu pro flukonazol v kategorii citlivý a citlivý v závislosti na dávce, avšak ne pro kategorii rezistentní. Tato nízká shoda v kategorii rezistentní je způsobena přítomností primárně rezistentních druhů nebo druhů se sníženou citlivostí k flukonazolu (*Aspergillus* spp., *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*) v testovaném souboru, na které naopak velmi dobře působí vorikonazol.

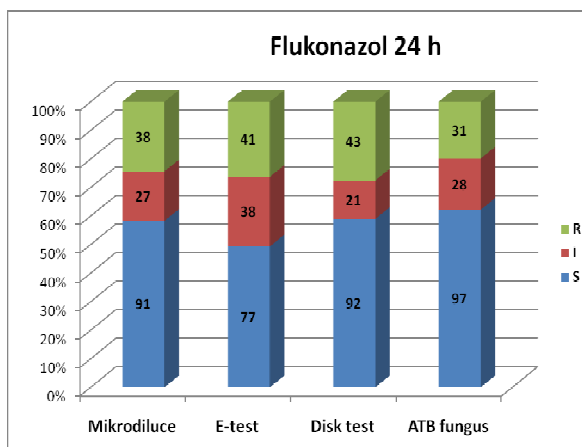
Výsledky testování citlivosti k antimykotikům (flukonazolu, itrakonazolu, ketokonazolu, vorikonazolu, amfotericinu B a flucytosinu) různými metodami (mikrodiluční bujónové metoda, E-test, diskový difúzní test, Fungitest ATB fungus) odpovídaly obecně známé citlivosti většiny testovaných druhů kvasinek a plísní. Metodiky lze rozdělit na kvantitativní (standardní mikrodiluční bujónové metody a zní vycházejících komerčních testů, včetně E-testu) stanovující hodnotu MIC a kvalitativní zařazujících testovaný izolát do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD) a rezistentní (R) (diskový difúzní test). Kvantitativní stanovení citlivosti k antimykotikům je však, nejenom ekonomicky žádoucí u izolátů, u kterých je vysoce pravděpodobné, že se jedná o kauzální agens invazivní, systémové nebo lokalizované infekce s chronickým průběhem. U ostatních houbových kmenů, zejména u rizikových pacientů, obvykle stačí pouze jejich monitorování založené na druhové identifikaci a prozatímním určení antifungální citlivosti. V těchto případech je pro rutinní laboratorní praxi mnohem vhodnější diskový difúzní test, který představuje levnou a nenáročnou alternativu ke kvantitativním metodám.

Při srovnávání a interpretaci výsledků jednotlivých metod testování antifungální citlivosti musí být brán v úvahu fakt, že jsou porovnávány odlišné testovací systémy (bujónová diluce vs. agarová difúze) a také, že jednotlivé metody se liší v rozsahu testovaných koncentrací, a tedy i hodnotách podle kterých budou zařazeny do interpretačních kategorií. Např. u Fungitestu (ačkoliv se jedná o metodu vycházející ze standardní bujónové mikrodiluce) se testují jen

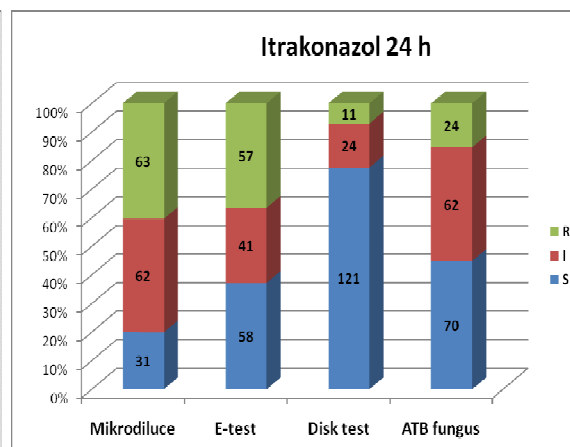
dvě hraniční koncentrace (v podstatě odpovídající navrženým break-pointům), což má vliv nejen na hodnoty korelačních koeficientů vůči ostatním metodám ale i na hodnoty základních statistických údajů (především geometrického průměru a směrodatné odchylky) testovaného souboru hub touto metodou. Z tohoto důvodu je vhodnější, a proto jsme se tak nakonec rozhodli, porovnávat naměřené výsledky v rámci kategorií (S, SDD/I, R) než jako hodnoty MIC.

Dalším problémem vyskytující při odečítání testů je stanovení end-pointu, tedy konkrétní testované koncentrace u bujónových dilučních technik, která je odečítána jako MIC, nebo místa sníženého nárůstu u agarové difúze, kde se odečítá okraj inhibiční zóny. U mikrodilučních metod může být problematické stanovit MIC zejména kvůli tzv. trailing efektu, kdy je obtížné stanovit hranici inhibice růstu vzhledem k tomu, že je obvykle patrný ve všech testovaných koncentracích. Také v případě diskového testu či E-testu může být výsledek zatížen subjektivní chybou vyplývající ze špatné rozlišitelnosti, a tedy i možnosti nesprávného odečtu zóny růstové inhibice. S tímto problémem jsme se setkali zejména u flucytosinu a ketokonazolu. U Fungitestu byl v některých případech sporný odečet zabarvení média (zejména u itraconazolu), což mohlo ovlivnit zařazení testovaného izolátu do interpretačních kategorií.

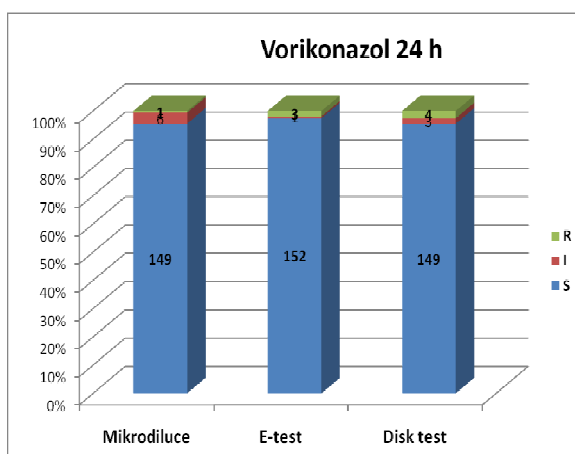
Rozdíly v interpretaci výsledků dále vyplývají z nastavení interpretačních kritérií u antimykotik (a metod), která doposud nebyla mezinárodně stanovena. Porovnání shody výsledků jednotlivých metod v rámci kategorií (S, SDD/I, R) se lišilo u některých antimykotik poměrně významně. Nejlepší shoda všech metod byla zaznamenána u vorikonazolu a flukonazolu jak po 24 h (Graf 3) tak po 48 h (Graf 9). Stejně tak tomu bylo i u amfotericinu B po 24 h (Graf 7), ale po 48 h byl u diskového testu vyšší podíl citlivých kmenů a u Fungitestu byly všechny izoláty v kategorii citlivý (Graf 13). U ketokonazolu vykazovaly lepší vzájemnou shodu (po 24 h i 48 h) E-test a diskový test než v porovnání s mikrodiluční metodou a zároveň i větší podíl citlivých kmenů (Graf 6 a 12).



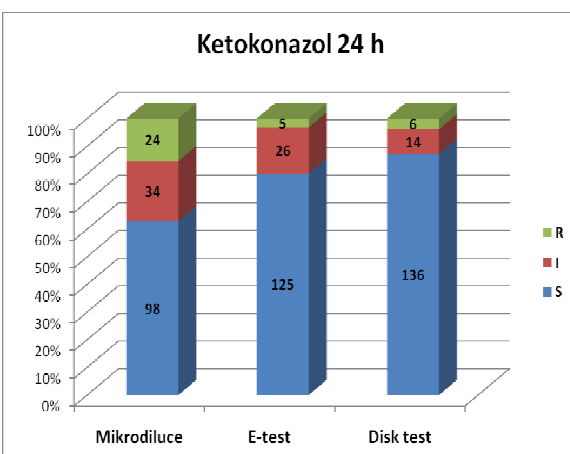
Graf 3. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro flukonazol po 24h



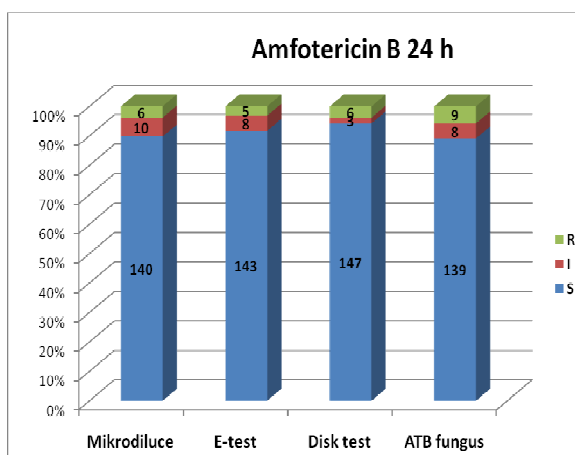
Graf 4. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro itrakonazol po 24 h



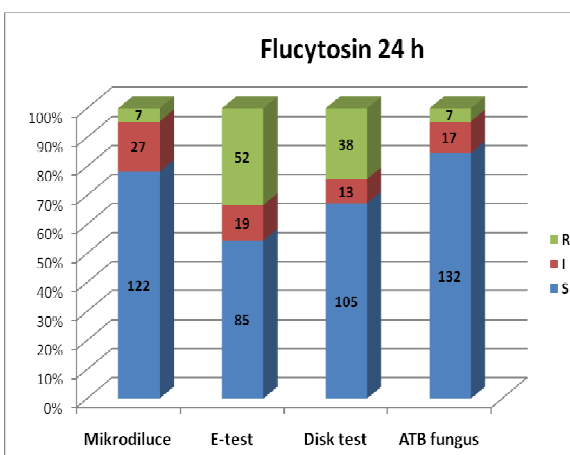
Graf 5. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro vorikonazol po 24h



Graf 6. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro ketokonazol po 24 h

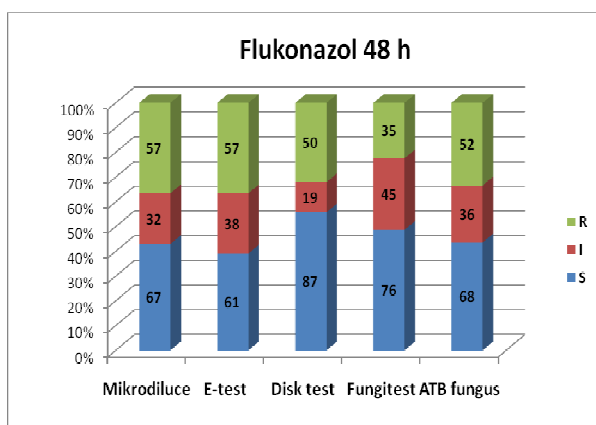


Graf 7. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro amfotericin B po 24h

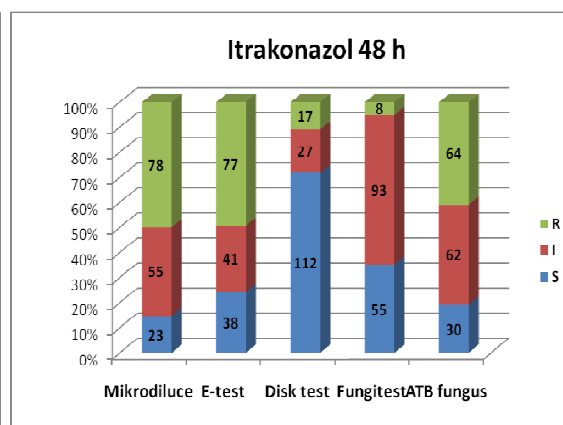


Graf 8. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro flucytosin po 24 h

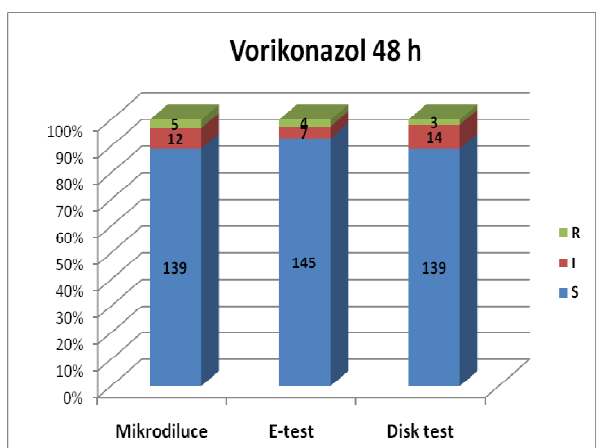
Nejhorší shody výsledků bylo dosaženo u itrakonazolu (Graf 4 a 10), který oproti mikrodiluční metodě detekoval velké množství kmenů jako citlivé. V případě itrakonazolu se pravděpodobně jednalo o falešnou citlivost vyplývající z neadekvátního nastavení hraničních hodnot pro diskový test. U flucytosinu (Graf 8 a 14) byla shoda nejvyšší u mikrodiluční metody a ATB fungus testu (po 24 h i 48 h). Po 48 h byl u E-testu vysoký podíl rezistentních izolátů, což je patrně důsledek problematického hodnocení okraje inhibiční zóny bez zřetelného ohraničení přecházející plynule v normální nárůst.



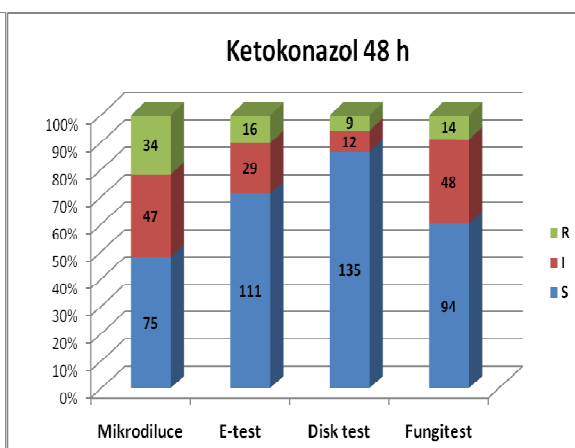
Graf 9. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro flukonazol po 48 h



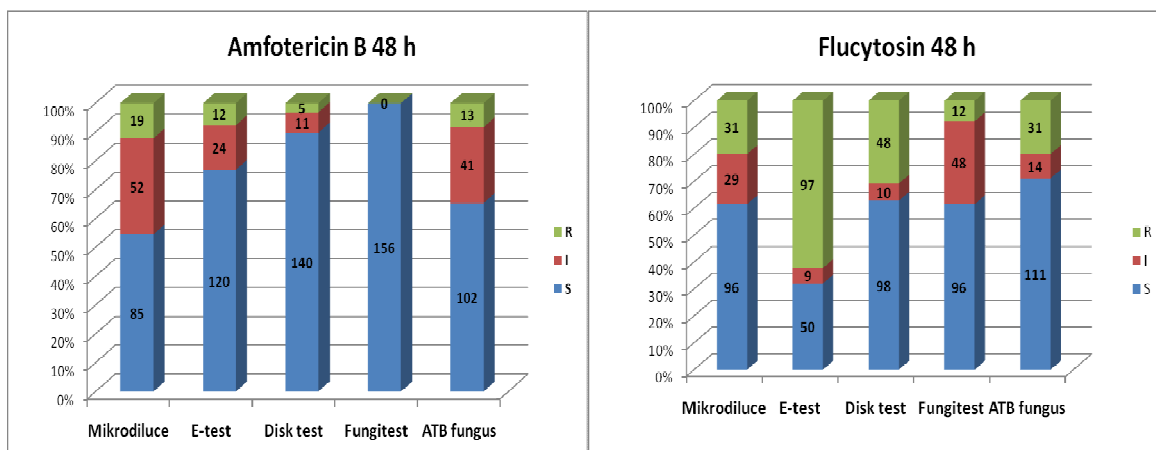
Graf 10. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro itrakonazol po 48 h



Graf 11. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro vorikonazol po 48 h



Graf 12. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro ketokonazol po 48 h



Graf 13. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro amfotericin B po 48 h

Graf 14. Srovnání distribuce kategorií (S, SDD, R) u jednotlivých metod pro flucytosin po 48 h

Srovnání výsledků jednotlivých metod po 24 h a 48 h u celého souboru testovaných kvasinek a plísní ukázalo významnou lineární souvislost všech metod zejména u flukonazolu a vorikonazolu (Tab. 31). Vysoké korelační koeficienty byly zjištěny při porovnání stejné metody po 24 h a 48 h především u mikrodiluční bujónové metody, E-testu a diskového testu (kolem hodnoty 0,9), což významně zvyšuje spolehlivost na výsledek testu již po 24 h (u mikrodiluce a E-testu). U komerčních stripů (Fungitest, ATB fungus) byly korelace pro některá antimykotika i skupiny hub nižší, proto by měl být dodržen čas pro odečet daného komerčního testu dle instrukcí výrobce (tj. 48 h). Velmi dobrých korelací bylo dosaženo srovnáním diskového difúzního testu po 24 h a E-testu po 48 h u všech antimykotik kromě flucytosinu (příčinou může být již zmíněné problematické hodnocení okraje zóny u E-testu a tedy i hodnoty MIC) u všech podskupin testovaných hub kromě *aspergilů* a *non-albicans* kandid se sníženou citlivostí k flukonazolu. Výborné korelace těchto dvou testů ve výše uvedených časech podporují fakt, že diskového difúzního testu lze využít jako skrínigového testu pro zjištění citlivosti daného kmene houby k antimykotikům.

7 ZÁVĚRY

- Pro test indukce tvorby klíčních hyf u *Candida albicans* lze jako alternativu k séru použít chemicky definované syntetické médium NYP. S výjimkou *C. glabrata*, všechny významné humánně patogenní kvasinky měly výraznou tendenci tvořit pseudomycelium.
- Chromogenní média poskytují dostatečně vysokou specifitu i senzitivitu k jejich využití k prozatímní identifikaci *C. albicans* a *C. tropicalis*.
- Agarové difúzní metody (diskový difúzní test a E-test) jsou vhodným skriningovým testem ke zjištění citlivosti houbových izolátů k flukonazolu a vorikonazolu. Výjimkou jsou některé druhy s variabilní vnitrodruhovou citlivostí k flukonazolu, zejména *C. glabrata*.
- U flukonazol citlivých druhů humánně patogenních hub lze využít stanovení citlivosti k flukonazolu pro predikci *in vitro* citlivosti k vorikonazolu (tzv. surrogate factor).
- Složení kultivačního media (MH agar vs. AST agar) nemělo dramatický vliv na shodu výsledků u agarové difúzní metody (E-testu a diskový test). Změna shody se neprojevila při odečtu inhibiční zóny u diskového testu po 24 h, ale významně poklesla po 48 h odečtu. Použití AST agaru poskytovalo konzistentnější, méně variabilní výsledky již po 24 h, zatímco u MH agaru optimální shody výsledků u diskového testu stejně jako E-testu bylo dosaženo až 48 h.
- Pro stanovení antifungální citlivosti lze použít všechny námi testované metody (mikrodiluční bujónovou metodu, E-test, diskový difúzní test, Fungitest a ATB fungus). U některých antimykotik je však třeba větší obezřetnosti vyplývající z technického nastavení metod (interpretační kritéria, stanovení end-pointu). Shoda výsledků s referenční mikrodiluční metodou je do jisté míry ovlivněna testovaným antimykotikem, druhem mykotického agens, testovacími podmínkami a hraničními hodnotami pro interpretaci výsledků. Nejlepší korelace byla zjištěna mezi stanovením citlivosti pomocí E-testu po 48 h a diskového difúzního testu po 24 h a to pro všechna testovaná antimykotika kromě flucytosinu.

8 SEZNAM LITERATURY

1. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, Reller LB. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. J Clin Microbiol. 2007;45(3):698-706.
2. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for diagnosis and management of invasive mycoses. Clin Infect Dis, 2006, 43(1):15-27.
3. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol. 2005;43(4):1829-1835.
4. Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Gottfredsson M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3489-92.
5. Bailey EM, Krakovsky DJ, Rybak MJ. The triazole antifungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. Pharmacotherapy 1990;10:146-153.
6. Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis J, Pfaller M, Rennie R, Rinaldi M, Rogers T, Traczewski M. Quality control limits for fluconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. J Clin Microbiol. 2003;41(7):3410-3412.
7. Barry AL, Brown SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. J Clin Microbiol. 1996;34(9):2154-7.
8. Bednář M, Fraňková V, Schnidler J et al. Lékařská mikrobiologie. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996 (344-355).
9. Borg-von Zepelin M, Wagner T. Fluorescence assay for the detection of adherent *Candida* yeasts to target cells in microtest plates. Mycoses. 1995;38(9-10):339-47.
10. Brown J. Zygomycosis: an emerging fungal infection. Am J Health Syst Pharm 2005;62:2593-2596.
11. Buchta V. Současné možnosti testování citlivosti hub k antifungálním látkám v podmínkách *in vitro*. Klin.Mikrobiol.Inf.Lék. 2002;8(3):110-120.
12. Buchta V. Testování antifungální aktivity *in vitro* ve farmaceutickém výzkumu a klinické praxi. Habilitační práce, 2002.
13. Buchta V, Jílek P, Horáček P, Horák V. Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998 (143-157).

14. Buchta V, Slezák R, Špaček J, Košťálová M, Vejsová M, Doležal M. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Klin Farmakol Farm* 2008;22(2):72-75.
15. Burn AK, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, McCarthy DI, Rinaldi MG, Redding SW. Comparison of antifungal susceptibilities to fluconazole and voriconazole of oral *Candida glabrata* isolates from head and neck radiation patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5846-5848.
16. Campbell CK, Holmes AD, Davey KG, Szekely A, Warnock DW. Comparison of a new chromogenic agar with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:367-368.
17. Cárdenes CD, Carrillo AJ, Arias A, et al. Comparison of Albicans ID2 agar plate with the germ tube for presumptive identification of *Candida albicans*, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:181-185.
18. Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(5):1289-90.
19. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Garcia Effron G, Rodriguez-Tudela JL. In vitro activities of ravuconazole and four other antifungal agents against fluconazole-resistant or -susceptible clinical yeasts isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3107-3111.
20. Decker H, Walz F, Borman C, Fiedler HP, Zahner H, Heitsch HH, König WA. Metabolic products of microorganisms. 225. Nikkomycins Wz and Wx, new chitin synthetase inhibitors from *Streptomyces tendae*. *J Antibiot* 1990;43:43-48.
21. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(4):230-40.
22. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003;362(9390):1142-1151.
23. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002;40(4):1298-1302.
24. Dlouhý P, Švejda J, Veselská A, Kalhousová V. Kandidové sepse. *Čas Lék Čes* 1993; 132(13):393-396.
25. Doležal M, Buchta V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství* 2006;1:10-14.

26. Dominguez JM, Martin JJ. Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2279-2283.
27. Dorko E, Kmeťová M, Bračoková I, Dorko F. Non-*albicans* *Candida* species izolované při kandidurii. Remed Klin Mikrob 1999;3:221-224.
28. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol. 2005;43 Spec No:65-84.
29. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol. 2005;43(8):3884-3889.
30. Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ. In Vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. Mycopathologia 2001;150:101-115.
31. Etest technical guide 4B, AB Biodisk, Sweden.
32. Feldmesser Y, Kress Y, Mednick A, Casadevall A. The effect of echinocandin analogue caspofungin on the cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. J Inf Dis 2000;182:1791-1795.
33. Filka J, Pisarčíková M, Kurák M, Uher M, Valanský L, Michalko T, Kurcinová Z, Bača M, Šašinka M, Molokáčová M, Sokol L. Kandidóza uropoetického traktu – Zriedkavá príčina akútnej renálnej insuficiencie v dojčenskom veku. Čs Pediat 1997;52:156-158.
34. Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. J Clin Microbiol. 1998;36(2):395-401.
35. Foongladda S, Haouharn P, Sakulmaiwatana P, Chaiprasert A. Comparative evaluation of CandiSelect test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates, Mycoses 2002;45:75-78.
36. Fagner P. Malá lékařská mykologie. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1984 (88-130).
37. Fagner P. Určování kvasinek izolovaných z lidského organismu. 1. vyd. Praha: Academia, 1992 (22-42).
38. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996;9:499-511.
39. Fromtling RA. Overview of medically important antifungal azole derivatives. Clin Microbiol Rev 1988;1:187-217.

40. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev 1999;12:501-517.
41. Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF et al. Lékařská mikrobiologie. Grada Publishing, Avicenum, 1999 (566-581).
42. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin Infect Dis. 2003;37(9):1172-1177.
43. Guinea J, Peláez T, Recio S, Torres-Narbona M, Bouza E. In vitro antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and fluconazole against 1,007 isolates of zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(4):1396-400.
44. Gumbo T, Isada CM, Hall G, Karafa MT, Gordon SM. *Candida glabrata* fungemia. Clinical features of 139 patients. Medicine (Baltimore) 1999;78:220–227.
45. Haber J, Otčenášek M. Antimykotika používaná k léčbě systémových mykóz. Remed Klin Mikrob 1998;2:108-115.
46. Haber J. Nová antimykotika – jaká jsou a co přinášejí. Remedia 2005;15(3):247-258.
47. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Randomised comparison of voriconazole and amphotericin B in primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med. 2002;347:408-415.
48. Hoppe JE, Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:188-191.
49. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol 2001;67:2982-2992.
50. Chang A, Neofytos D, Horn D. Candidemia in the 21st century. Future Microbiol. 2008;3:463-472.
51. Chapman WC, Sullivan DC, Cleary JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2008;199:197-216.
52. Chládková J, Martínková J, Hak J, Slavík Z. Plicní kandidóza při febrilní neutropenii. Remedia 1996;6:82-86.
53. Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HM, Matheson MM, Adamson P, Okhravi N, Lightman S. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. J Clin Microbiol. 2000;38(8):2902-2908.

54. Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG, Fung HB. Voriconazole. Clin Ther. 2003;25(5):1321-1381. Review.
55. Johnson LB, Kauffman CA. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. Clin Infect Dis. 2003 1;36(5):630-637.
56. Kanbe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. Yeast. 2002;19(11):973-989.
57. Kirkpatrick WR, Perea S, Coco BJ, Patterson TF. Efficacy of ravuconazole (BMS-207147) in a guinea pig model of disseminated aspergillosis. J Antimicrob Chemother 2002;49:353-357.
58. Koleta F. Infekce a zánět v gynekologii a porodnictví. 1. vyd. Praha: Grada, 1995 (18-23).
59. Kotyza J, Tomšíková A. Sekreční proteáza patogenních kandid. Čs Epid Mikrob Imunol 1995;44:33-35.
60. Krčméry V Jr, Kovačičová G. Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: trends in etiology in 310 episodes. Slovak Fungaemia study group. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;36(1):7-11.
61. Kubec K. Mykotické choroby kůže a jejích adnex. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1983 (184-211).
62. Kuse ER, Chetchotisakd P, da Cunha CA, Ruhnke M, Barrios C, Raghunadharao D, Sekhon JS, Freire A, Ramasubramanian V, Demeyer I, Nucci M, Leelarasamee A, Jacobs F, Decruyenaere J, Pittet D, Ullmann AJ, Ostrosky-Zeichner L, Lortholary O, Koblinger S, Diekmann-Berndt H, Cornely OA; Micafungin Invasive Candidiasis Working Group. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. Lancet. 2007;369(9572):1519-1527.
63. Larone MD. Medically important fungi: a guide to identification. 3. vyd. Am. Soc. for Microbiol., Washington D.C. 1995.
64. Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, Pfaller MA, Rex JH. Lot-to-lot variability of Antibiotic Medium 3 used for testing susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B. J Clin Microbiol 1997;35:270–272.
65. Mackenzie DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. J Clin Pathol 1962;15:65-67.
66. Marichal P, Gorrens J, Van Cutsem J, Vanden Bossche H. Culture media for the study of the effects of azole derivatives on germ tube formation and hyphal growth of *C. albicans*. Mykosen 1986;29:76-81.
67. Marines HM, Osato MS, Font RL. The value of calcofluor white in the diagnosis of mycotic and *Acanthamoeba* infections of the eye and ocular adnexa. Ophthalmology. 1987;94(1):23-26.

68. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(5):1647-1651.
69. Morace G, Amato G, Bistoni F, Fadda G, Marone P, Montagna MT, Oliveri S, Polonelli L, Rigoli R, Mancuso I, La Face S, Masucci L, Romano L, Napoli C, Tatò D, Buscema MG, Belli CM, Piccirillo MM, Conti S, Covan S, Fanti F, Cavanna C, D'Alò F, Pitzurra L. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2002;40(8):2953-2958.
70. Morace G., Polonelli L. for the GISIA Group. Voriconazole activity against clinical yeast isolates: a multicentre Italian study. *Internat. J. Antimicrob Agents* 2005;26:247–253.
71. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution testing of yeasts: approved standard, 2nd ed., M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.
72. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2004.
73. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton DA, Rinaldi MG. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis*. 1998;177(2):425-30.
74. Odds FC. Epidemiological shifts in opportunistic and nosocomial *Candida* infections: Mycological aspects. *Internat J Antimicrob Agents* 1996;6:141-144.
75. Otčenášek M, Hejtmánek M, Manych J, Tomšíková A. Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních. Praha: Avicenum, 1990.
76. Pappas PG. Amphotericin B lipid complex in the treatment of invasive fungal infections: results of Collaborative Exchange of Antifungal Research (CLEAR), an industry-supported patient registry. *Clin Infect Dis* 2005;40(6):379-383.
77. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:86-124.
78. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 2005;366:1013-1025.
79. Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, Greenberg RN, DuPont B, de la Torre-Cisneros J, Just-Nubling G, Schlamm HT, Lutsar I, Espinel-Ingroff A, Johnson E. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis*. 2003 1;36(9):1122-1131.

80. Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmström A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. J Clin Microbiol. 2001;39(1):339-42.
81. Pfaller MA. Anidulafungin: an echinocandin antifungal. Expert Opin Investig Drugs 2004;13(9):1183-1197.
82. Pfaller MA, Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis JF, Rennie R, Rinaldi M, Rogers T, Traczewski M. Quality control limits for voriconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. J Clin Microbiol. 2004;42(4):1716-1718.
83. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. J Clin Microbiol. 2004;42(11):4977-4979.
84. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol. 2005;43(12):5848-5859.
85. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by Broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1440-1446.
86. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Troke P, Walsh TJ, Warnock DW. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol. 2006;44(3):819-826.
87. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimen for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol 1996;34:58-61.
88. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. Ann Surg. 1994;220(6):751-758.
89. Rabkin JM, Orolloff SL, Corless CL, Benner KG, Flora KD, Rosen HR, Olyaei AJ. Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients. Am J Surg. 2000;179(5):426-430.
90. Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, Křen L, Křikavová L, Mayer J. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. Postgrad Med, 2007;9(3):3-14.

91. Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, Betts R, Wible M, Goldstein BP, Schranz J, Krause DS, Walsh TJ; Anidulafungin Study Group. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2007;356(24):2472-2482.
92. Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):109-111.
93. Rozsypal H. Systémová antimykotika. *Klin Farmakol Farm* 2008;22(1):40-44.
94. Sákra L, Motyčka V, Mencl K, Havlíček K. Kvasinkové infekce u pacientů na chirurgické JIP. Referát. 2. Česko-slovenská mezioborová konference lékařské mykologie, Pardubice 2000.
95. Sambatakou H, Dupont B, Lode H, Denning DW. Voriconazole treatment for subacute invasive and chronic pulmonary aspergillosis. *Am J Med.* 2006;119(6):527.e17-24.
96. Serrano MC, Ramirez M, Morilla D, Valverde A, Chavez M, Espinel-Ingroff A, Claro R, Fernandez A, Almeida C, Martin-Mazuelos E. A comparative study of the disc diffusion method with the broth microdilution and Etest methods for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53(5):739-742.
97. Slezák R, Dřížhal I, Horáček J, Kopecký O. Infekční choroby ústní sliznice. Grada, 1997 (71-76).
98. Steinbach WJ, Perfect JR, Cabell CH, et al. A meta-analysis of medical versus surgical therapy for *Candida* endocarditis. *J Infect* 2005;51:230-247.
99. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2004;12:317-324.
100. Sun QN, Forthergill AW, McCarthy DI, Rinaldi MG, Graybill JR. In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1581-1582.
101. Swinne D, Watelle M, Van der Flaes M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole (UK-109, 496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non-*albicans* bloodstream yeast isolates (CANARI study). *Mycoses.* 2004;47(5-6):177-183.
102. Špaček J, Buchta V, Jílek P, Krejsek J, Pidrman V, Kalousek I, Matula V, Kestřánek J, Drahošová M, Vejsová M, Förstl M. Rekurentní vulvovaginální kandidóza – současný stav problematiky a léčebné možnosti. *Čes Gynek* 2008;73(3):179-184.

103. Tomšíková A. *Candida dubliniensis* – nový patogen? Remed Klin Mikrob 2000;4:201-204.
104. Tomšíková A. Mykosisy CNS. Klin Mikrob 1995;2:13-15.
105. Tomšíková A. Mykotická onemocnění respiračního traktu. Remed Klin Mikrob 1999;3:217.
106. Tomšíková A. Mykózy oro-gastro-intestinálního traktu. Remed Klin Mikrob 1997;1:79-83.
107. Tomšíková A. Nové aspekty patogeneze rekurentní vaginální kandidózy. Remed Klin Mikrob 1998;2:116-121.
108. Tomšíková A. Nozokominální mykotické infekce. Klin Mikrobiol Inf Lék 1996;2(5):91-96.
109. Tomšíková A. Vědecká setkání v mykologii. Remed Klin Mikrob 1999;3(3):93-95.
110. Tomšíková A. Význam adhezenční schopnosti kandid pro patogenezi slizničních a kožních kandidóz. Čs Epidem Mikrob Imunol 1990;39:182-190.
111. Vejsová M, Buchta V. Předběžná identifikace *Candida albicans* pomocí rychlých diagnosických testů. Klin Mikrobiol Inf Lék 2006;12(5):180-183.
112. Vincent JL, Anaissie E, Bruining H. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. Intensive Care Med. 1998;24(3):206-216.
113. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Krcmery V, De Pauw B, Meunier F. Candidaemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Clin Infect Dis 1999;28:1071–1079.
114. Walsh TJ, Lutsar I, Driscoll T, Dupont B, Roden M, Ghahramani P, Hodges M, Groll AH, Perfect JR. Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. Pediatr Infect Dis J. 2002;21(3):240-248.
115. Zaas AK, Alexander BD. Echinocandins: role in antifungal therapy. Expert Opin Pharmacother 2005;6(10):1657-1668.

9 SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ

Seznam tabulek

Tab. 1. Přehled nejdůležitějších antifungálních látek a jejich mechanismus účinku.....	34
Tab. 2. Biologický materiál pro mykologické vyšetření.....	46
Tab. 3. Interpretační kritéria standardu CLSI M 44-A (velikost zón v mm).....	65
Tab. 4. Interpretační kritéria standardu CLSI M27–A2 (MIC v µg/ml).....	67
Tab. 5. Spektrum a počet kvasinek zahrnutých do studií zaměřených na rychlé diag. testy.....	72
Tab. 6. Spektrum a počet kvasinek zahrnutých do studií zaměřených na testování citlivosti.....	73
Tab. 7. Interpretační kritéria pro testované antifungální látky.....	82
Tab. 8. Srovnání tvorby klíčních hyf, pseudohyf a pseudomycelia v závislosti na použitém indukčním médiu a podle druhu kvasinky.....	83
Tab. 9. Výsledky hodnocení růstu kvasinek na chromogenních médiích.....	85
Tab.10 Specificita a senzitivita testu klíčních hyf a hodnocení růstu na chromogenních médiích u testovaných kmenů <i>C. albicans</i> a <i>C. tropicalis</i>	85
Tab. 11. Výsledky hodnocení růstu kmenů <i>C. albicans</i> a <i>C. tropicalis</i> na chromogenních médiích.....	86
Tab. 12. Senzitivita a specificita testů pro kmeny <i>C. albicans</i> a <i>C. tropicalis</i> na chromogenních médiích.....	87
Tab. 13. Srovnání shody výsledků testování citlivosti k flukonazolu E-testem a diskovým difúzním testem.....	89
Tab. 14. Srovnání shody výsledků testování citlivosti k vorikonazolu E-testem a diskovým difúzním testem.....	89
Tab. 15. Vliv metody testování a doby odečtu na shodu výsledků citlivosti k flukonazolu a vorikonazolu pomocí E-testu a diskového testu.....	90
Tab. 16. Predikce (surrogate factor) výsledků testování citlivosti k vorikonazolu na základě výsledků testování k flukonazolu pomocí diskového testu po 24 h.....	91
Tab. 17. Predikce (surrogate factor) výsledků testování citlivosti k vorikonazolu na základě výsledků testování k flukonazolu pomocí E-testu po 48 h.....	92
Tab. 18. Predikce (surrogate factor) výsledků testování citlivosti k vorikonazolu Etestem po 48 h na základě výsledků testování k flukonazolu pomocí diskového testu po 24 h.....	93
Tab. 19. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro celý soubor (n=156) houbových kmenů po 24 h.....	95
Tab. 20. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro <i>Aspergillus</i> spp.* (n=28) po 24 h.....	95
Tab. 21. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro <i>Candida albicans</i> (n=17) po 24 h.....	96
Tab. 22. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro non- <i>albicans Candida</i> * (n=44) druhy rezistentní k flukonazolu po 24 h.....	96
Tab. 23. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro non- <i>albicans Candida</i> * (n=43) druhy citlivé k flukonazolu po 24 h.....	97

Tab. 24. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro ostatní kvasinky* (n=24) po 24 h.....	97
Tab 25. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro celý soubor (n=156) houbových kmenů po 48 h.....	98
Tab. 26. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro <i>Aspergillus</i> spp.* (n=28) po 48 h.....	98
Tab. 27. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro <i>Candida albicans</i> (n=17) po 48 h.....	99
Tab. 28. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro non- <i>albicans Candida</i> * (n=44) druhy rezistentní k flukonazolu po 48 h.....	99
Tab 29. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro non- <i>albicans Candida</i> * (n=43) druhy citlivé k flukonazolu po 48 h.....	100
Tab. 30. Srovnání základních statistických parametrů citlivosti k vybraným antimykotikům u mikrodiluční bujónové metody, E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu pro ostatní kvasinky* (n=24) po 48 h.....	100
Tab. 31. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro všechny testované kmeny.....	102
Tab. 32. Spearmanovy korelační koeficienty pro 24 h pro všechny testované kmeny.....	103
Tab. 33. Spearmanovy korelační koeficienty pro 48 h pro všechny testované kmeny.....	104
Tab. 34. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 24 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u všech testovaných kmenů (n = 156).....	106
Tab. 35. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u všech testovaných kmenů (n = 156).....	107
Tab. 36. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů <i>Aspergillus</i> spp. (n = 28).....	133
Tab. 37. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů <i>Candida albicans</i> (n = 17).....	134
Tab. 38. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů non- <i>albicans Candida</i> se sníženou citlivostí k flukonazolu (n = 44).....	135
Tab. 39. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů non- <i>albicans Candida</i> citlivé k flukonazolu (n = 43).....	136
Tab. 40. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n = 10), <i>Blastoschizomyces capitatus</i> (n = 7), <i>Trichosporon</i> spp.(n = 7).....	137
Tab. 41. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro <i>Aspergillus</i> sp. (n = 28).....	138
Tab. 42. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro <i>C. albicans</i> (n = 17).....	139
Tab. 43. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro non- <i>albicans Candida</i> kmeny se sníženou citlivostí k flukonazolu (n = 44).....	140
Tab. 44. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro non- <i>albicans Candida</i> kmeny citlivé k flukonazolu (n = 43).....	141

Tab. 45. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro *Sachcaromyces cerevisiae* (n = 10), *Blastoschizomyces capitatus* (n = 7) a *Trichosporon* sp. (n = 7).....142

Seznam grafů

Graf 1. Srovnání kvantitativního zastoupení klíčních hyf u kmenů <i>C. albicans</i> v séru a indukčním médiu NYP.....	84
Graf 2. Srovnání kvantitativního zastoupení pseudohyf u kmenů <i>C. albicans</i> v séru a indukčním médiu NYP.....	84
Graf 3. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro flukonazol po 24 h.....	116
Graf 4. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro itrakonazol po 24 h.....	116
Graf 5. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro vorikonazol po 24 h.....	116
Graf 6. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro ketokonazol po 24 h.....	116
Graf 7. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro amfotericin B po 24 h.....	116
Graf 8. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro flucytosin po 24 h.....	116
Graf 9. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro flukonazol po 48 h.....	117
Graf 10. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro itrakonazol po 48 h.....	117
Graf 11. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro vorikonazol po 48 h.....	117
Graf 12. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro ketokonazol po 48 h.....	117
Graf 13. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro amfotericin B po 48 h.....	118
Graf 14. Proporční srovnání kategorií u jednotlivých metodik pro flucytosin po 48 h.....	118

Seznam obrázků

Obr. 1. Pučící blastospora.....	15
http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/images/calbsem.jpg	
Obr. 2. Chlamydospory <i>C. albicans</i> na kukuřičném agaru.....	16
http://www.christinas-home-remedies.com/image-files/candida-albicans-picture1.jpg	
Obr. 3. Dimorfismus <i>C. albicans</i> (Gramovo barvení, 1000x).....	17
http://overcomingcandida.com/mycology/candida200.jpg	
Obr. 4. Interdigitální kandidóza.....	24
http://ashi.myweb.uga.edu/candiasis_basic2.jpg	
Obr. 5. Paronychium.....	25
http://dic.academic.ru/pictures/enwiki/80/Paronychchia.jpg	
Obr. 6. Kandidová onychomykóza.....	25
http://z.hubpages.com/u/374544_f520.jpg	
Obr. 7. Chronická forma hyperplastická.....	27
http://img.tfd.com/mosby/thumbs/500051-fx4.jpg	
Obr. 8. Angulární cheilitida.....	28
http://www.doctorspiller.com/images/OralAnatomy/AngularCheilitis.jpg	
Obr. 9. Amfotericin B - chemická struktura.....	36
Obr. 10. Nystatin - chemická struktura.....	37
Obr. 11. Natamycin - chemická struktura.....	37
Obr. 12. Flucytosin – chemická struktura.....	38
Obr. 13. Mikonazol – chemická struktura.....	39
Obr. 14. Ketokonazol – chemická struktura.....	40

Obr. 15. Flukonazol – chemická struktura.....	40
Obr. 16. Itrakonazol – chemická struktura.....	41
Obr. 17. Vorikonazol – chemická struktura.....	42
Obr. 18. Posakonazol – chemická struktura.....	42
Obr. 19. Ravukonazol – chemická struktura.....	43
Obr. 20. Kaspofungin – chemická struktura.....	44
Obr. 21. Anidulafungin – chemická struktura.....	45
Obr. 22. Kvasinky obarvené dle Grama (1000x).....	48
http://www.skinandaging.com/files/imagecache/normal/photos/sa05_si_candida02.tif.jpg	
Obr. 23. Fluorescenční barvení – pučící buňky <i>C. albicans</i>	48
http://overcomingcandida.com/mycology/candid.jpg	
Obr. 24. Stříbření dle Grocotta (šipka ukazuje pučící buňku) (1000x).....	49
http://www.missionforvisionusa.org/anatomy/uploaded_images/CandidaGMS-780502.jpg	
Obr. 25. Axanogram – <i>C. lusitanae</i> po 24 h inkubaci při 27°C.....	52
Obr. 26. ID 32 C – v horní polovině <i>C. krusei</i> , v dolní polovině <i>C. parapsilosis</i> po 48 h inkubaci při 30°C.....	53
Obr. 27. Auxacolor.....	54
http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/ug/ugteach/dental/tutorials/images/fungi/auxacolor.jpg	
Obr. 28. Chromogenní agary (<i>C. albicans</i> po 24 h kultivaci na HiCrome Candida agaru a CandiSelect 4 agaru ve srovnání s kultivací na Sabouraudově glukózovém agaru (dole))...56	
Obr. 29. Kliční hyfy <i>C. albicans</i> (zvětšeno 400x).....	57
http://www.pfdb.net/photo/iwaguchi_s/box1/standard/germ_tube-1.jpg	
Obr. 30. <i>C. albicans</i> na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail).....	58
Obr. 31. <i>C. glabrata</i> na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail).....	58
Obr. 32. <i>C. tropicalis</i> na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail).....	59
Obr. 33. <i>C. parapsilosis</i> na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail).....	60
Obr. 34. <i>C. krusei</i> na Saubouraudově glukózovém agaru po 7 denní kultivaci při 35°C (vpravo detail).....	60
Obr. 35. Diskový difúzní test (<i>C. albicans</i>).....	64
Obr. 36. E-test (<i>C. albicans</i>).....	66
Obr. 37. Mikrodiluční bujónová metoda.....	67
Obr. 38. Fungitest.....	69
Obr. 39. ATB fungus 2.....	70

10 PŘÍLOHA

Tabulka 36. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů *Aspergillus* spp. (n = 28)

Antimykotikum	Metoda	MN (%)	VN (%)	VVN (%)	Celková shoda (%)
Flukonazol	E-test	0	0	0	100
	Disk test	0	0	0	100
	Fungitest	7,1	0	0	92,9
	ATB fungus	0	0	0	100
Itrakonazol	E-test	39,3	35,7	0	25,0
	Disk test	25	10,7	10,7	53,6
	Fungitest	46,5	0	7,1	46,4
	ATB fungus	57,1	28,6	0	14,3
Ketokonazol	E-test	39,3	0	0	60,7
	Disk test	46,4	0	21,4	32,2
	Fungitest	28,5	0	3,6	67,9
Vorikonazol	E-test	3,6	0	0	96,4
	Disk test	14,3	0	0	85,7
Amfotericin B	E-test	39,3	0	7,1	53,6
	Disk test	53,6	0	10,7	35,7
	Fungitest	67,8	0	28,6	3,6
	ATB fungus	57,1	0	3,6	39,3
Flucytosin	E-test	21,4	3,6	0	75,0
	Disk test	35,7	3,6	28,6	32,1
	Fungitest	57,1	0	0	42,9
	ATB fungus	32,1	0	0	67,9

MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 37. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů *Candida albicans* (n = 17)

Antimykotikum	Metoda	MN (%)	VN (%)	VVN (%)	Celková shoda (%)
Flukonazol	E-test	5,8	0	5,9	88,3
	Disk test	11,7	0	5,9	82,4
	Fungitest	0	0	0	100
	ATB fungus	11,7	41,2	0	47,1
Itrakonazol	E-test	52,9	0	11,8	35,3
	Disk test	64,7	0	17,6	17,7
	Fungitest	58,7	0	5,9	35,4
	ATB fungus	70,6	0	0	29,4
Ketokonazol	E-test	5,8	0	11,8	82,4
	Disk test	11,7	0	11,8	76,5
	Fungitest	0	0	5,9	94,1
Vorikonazol	E-test	5,9	0	0	94,1
	Disk test	11,8	0	0	88,2
Amfotericin B	E-test	17,6	0	0	82,4
	Disk test	17,6	0	0	82,4
	Fungitest	17,6	0	0	82,4
	ATB fungus	17,6	0	0	82,4
Flucytosin	E-test	5,8	82,4	0	11,8
	Disk test	0	23,5	0	76,5
	Fungitest	0	0	0	100
	ATB fungus	0	0	0	100

MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 38. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů *non-albicans Candida* se sníženou citlivostí k flukonazolu (n = 44)

Antimykotikum	Metoda	MN (%)	VN (%)	VVN (%)	Celková shoda (%)
Flukonazol	E-test	33,1	2,3	3,3	61,3
	Disk test	41,0	0	6,8	52,2
	Fungitest	54,6	0	2,3	43,1
	ATB fungus	47,8	0	4,5	47,7
Itrakonazol	E-test	29,6	0	0	70,4
	Disk test	43,2	0	38,6	18,2
	Fungitest	70,5	0	4,5	25,0
	ATB fungus	40,9	0	0	59,1
Ketokonazol	E-test	52,2	0	2,3	45,5
	Disk test	47,8	0	4,5	47,7
	Fungitest	36,4	0	0	63,6
Vorikonazol	E-test	25,0	0	0	75,0
	Disk test	27,3	0	0	72,7
Amfotericin B	E-test	34,1	0	4,5	61,4
	Disk test	25,0	0	6,8	68,2
	Fungitest	25,0	0	6,8	68,2
	ATB fungus	36,4	0	6,8	56,8
Flucytosin	E-test	43,2	18,2	0	38,6
	Disk test	45,5	2,3	0	52,2
	Fungitest	90,1	0	0	90,9
	ATB fungus	25,0	0	4,5	70,5

MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 39. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů *non-albicans Candida* citlivé k flukonazolu (n = 43)

Antimykotikum	Metoda	MN (%)	VN (%)	VVN (%)	Celková shoda (%)
Flukonazol	E-test	27,9	0	7,0	65,1
	Disk test	7,0	0	7,0	86,0
	Fungitest	9,2	0	4,7	86,1
	ATB fungus	14,0	11,6	0	74,4
Itrakonazol	E-test	46,4	0	7	46,6
	Disk test	69,7	0	23,3	7,0
	Fungitest	69,7	0	4,7	25,6
	ATB fungus	58,1	0	2,3	39,6
Ketokonazol	E-test	11,6	0	16,3	72,1
	Disk test	18,6	0	16,3	65,1
	Fungitest	20,9	0	11,6	67,5
Vorikonazol	E-test	7,0	0	7,0	86,0
	Disk test	7,0	0	7,0	86,0
Amfotericin B	E-test	25,6	0	2,3	72,1
	Disk test	25,6	0	2,3	72,1
	Fungitest	25,6	0	2,3	72,1
	ATB fungus	37,3	2,3	2,3	58,1
Flucytosin	E-test	13,9	37,2	0	48,9
	Disk test	9,3	9,3	0	81,4
	Fungitest	7,0	0	7,0	86,0
	ATB fungus	16,3	0	0	83,7

MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 40. Srovnání shody výsledků testování antifungální citlivosti po 48 h pomocí E-testu, diskového testu, Fungitestu a ATB Fungus testu s referenční mikrodiluční bujónovou metodou u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* (n = 10), *Blastoschizomyces capitatus* (n = 7), *Trichosporon* spp.(n = 7)

Antimykotikum	Metoda	MN (%)	VN (%)	VVN (%)	Celková shoda (%)
Flukonazol	E-test	25,0	0	0	75,0
	Disk test	50,0	0	0	50,0
	Fungitest	20,9	0	0	79,1
	ATB fungus	37,5	0	0	62,5
Itrakonazol	E-test	20,8	0	8,3	70,9
	Disk test	29,2	0	54,2	16,6
	Fungitest	83,4	0	8,3	8,3
	ATB fungus	50,0	0	4,2	45,8
Ketokonazol	E-test	33,4	0	0	66,6
	Disk test	29,1	0	4,2	66,7
	Fungitest	8,3	0	0	91,7
Vorikonazol	E-test	4,2	0	0	95,8
	Disk test	4,2	0	0	95,8
Amfotericin B	E-test	41,7	0	20,8	37,5
	Disk test	37,5	0	29,2	33,3
	Fungitest	33,3	0	29,2	37,5
	ATB fungus	50,0	4,2	8,3	37,5
Flucytosin	E-test	16,7	12,5	0	70,8
	Disk test	12,5	0	0	87,5
	Fungitest	8,4	0	0	91,6
	ATB fungus	8,4	0	0	91,6

MN – malá neshoda, VN – velká neshoda, VVN - velmi velká neshoda

Tabulka 41. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro *Aspergillus sp.*
(n = 28)

Flukonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
E-test 24h	0,0000	0,0000	0,0302	0,1245	0,4082
Disk test 24h	0,0000	0,0000	0,7431	-0,0601	-0,0942
ATB fungus 24h	0,0000	0,0000	-0,1640	0,1636	0,6225

Itrakonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8578	0,7406	-0,0885	0,1840	0,3409
E-test 24h	0,2937	0,3001	-0,3172	-0,0778	0,1243
Disk test 24h	-0,0888	-0,1910	0,6227	-0,0195	-0,2642
ATB fungus 24h	-0,2914	0,1088	-0,0349	0,3258	0,4812

Ketokonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h
Mikrodiluce 24h	0,8279	0,1789	-0,4917	0,3505
E-test 24h	-0,0693	0,5180	-0,3275	-0,2052
Disk test 24h	-0,3720	-0,4910	0,5518	-0,1237

Vorikonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h
Mikrodiluce 24h	0,7079	0,4239	-0,3638
E-test 24h	-0,1170	0,2480	-0,0861
Disk test 24h	-0,1832	-0,5005	0,8338

Amfotericin B	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8232	0,6863	-0,5556	0,0000	0,6058
E-test 24h	0,5139	0,7028	-0,7197	0,0000	0,6912
Disk test 24h	-0,4489	-0,8514	0,7583	0,0000	-0,6850
ATB fungus 24h	0,4491	0,6958	-0,5302	0,0000	0,7729

Flucytosin	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,2313	0,1922	-0,3848	-0,0051	0,4043
E-test 24h	0,4572	0,4268	0,1671	0,4195	0,3867
Disk test 24h	-0,0514	0,1837	0,6912	0,1720	-0,1493
ATB fungus 24h	0,1825	0,2230	-0,2230	0,1784	0,4593

Tabulka 42. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro *C. albicans*

(n = 17)

Flukonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,9635	0,6107	-0,4707	0,6910	0,4054
E-test 24h	0,5022	0,9813	-0,5848	0,2009	0,3337
Disk test 24h	-0,5551	-0,7424	0,5299	-0,2587	-0,4627
ATB fungus 24h	0,6820	0,4858	-0,3874	0,5513	0,4870

Itrakonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,6596	0,4900	-0,3531	0,8036	0,4052
E-test 24h	0,3342	0,9919	-0,6856	0,6335	0,3314
Disk test 24h	-0,4259	-0,6335	0,8807	-0,5090	-0,1636
ATB fungus 24h	0,3898	0,6189	-0,8059	0,6178	0,2593

Ketokonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h
Mikrodiluce 24h	0,9670	0,6808	-0,5026	0,5865
E-test 24h	0,4868	0,8769	-0,6805	0,4353
Disk test 24h	-0,6663	-0,3991	0,3507	-0,6588

Vorikonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h
Mikrodiluce 24h	1,0000	0,4664	-0,5105
E-test 24h	0,4849	0,9754	-0,7612
Disk test 24h	-0,4490	-0,7968	0,8864

Amfotericin B	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,5937	0,7493	-0,3858	0,0000	0,2863
E-test 24h	0,2798	0,9315	-0,7028	0,0000	0,1721
Disk test 24h	-0,1822	-0,6758	0,8803	0,0000	-0,3847
ATB fungus 24h	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Flucytosin	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,6776	-0,0692	-0,4325	0,0000	0,3516
E-test 24h	0,2103	0,6771	-0,2606	0,0000	0,2001
Disk test 24h	-0,2147	-0,0526	0,8540	0,0000	0,1533
ATB fungus 24h	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tabulka 43. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro *non-albicans Candida* kmeny se sníženou citlivostí k flukonazolu (n = 44)

Flukonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,5768	0,5661	-0,6554	0,4651	0,6590
E-test 24h	0,2712	0,8588	-0,6598	0,5932	0,7532
Disk test 24h	-0,3314	-0,5821	0,9763	-0,5933	-0,7059
ATB fungus 24h	0,4003	0,6308	-0,7214	0,7259	0,8568

Itrakonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,7910	0,5782	-0,4891	0,3963	0,6460
E-test 24h	0,4068	0,9137	-0,4905	0,2211	0,6745
Disk test 24h	-0,5540	-0,6194	0,9472	-0,5209	-0,6974
ATB fungus 24h	0,3841	0,5875	-0,6414	0,3760	0,7229

Ketokonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h
Mikrodiluce 24h	0,6408	0,4394	-0,7045	0,5648
E-test 24h	0,3077	0,8436	-0,3874	0,4877
Disk test 24h	-0,5363	-0,5861	0,9501	-0,6236

Vorikonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h
Mikrodiluce 24h	0,7499	0,2558	-0,0826
E-test 24h	0,6742	0,7434	-0,2990
Disk test 24h	-0,3404	-0,3490	0,8644

Amfotericin B	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8522	0,4118	-0,0410	0,0000	0,1771
E-test 24h	0,1353	0,9444	-0,6660	0,0000	0,3504
Disk test 24h	0,3749	-0,5717	0,9420	0,0000	-0,3559
ATB fungus 24h	0,2795	0,4940	-0,3000	0,0000	0,7548

Flucytosin	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,9333	0,6330	-0,6333	0,8015	0,8849
E-test 24h	0,6414	0,8905	-0,3466	0,5815	0,5994
Disk test 24h	-0,7666	-0,4404	0,9212	-0,6670	-0,7163
ATB fungus 24h	0,8809	0,6083	-0,5726	0,8749	0,9574

Tabulka 44. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro *non-albicans Candida* kmeny citlivé k flukonazolu (n = 43)

Flukonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8191	0,6401	-0,7479	0,4665	0,5227
E-test 24h	0,7091	0,8803	-0,6743	0,4243	0,4572
Disk test 24h	-0,5480	-0,5741	0,8463	-0,3368	-0,5527
ATB fungus 24h	0,7692	0,6176	-0,8033	0,3782	0,7867

Itrakonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8575	0,4914	-0,3501	0,4326	0,4828
E-test 24h	0,4768	0,8551	-0,2509	0,2965	0,1671
Disk test 24h	-0,4485	-0,3824	0,9825	-0,3369	-0,3953
ATB fungus 24h	0,5109	0,3524	-0,3696	0,4519	0,6455

Ketokonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h
Mikrodiluce 24h	0,9045	0,2966	-0,4061	0,4100
E-test 24h	0,1267	0,8056	-0,3005	0,1477
Disk test 24h	-0,2956	-0,3622	0,8996	-0,2789

Vorikonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h
Mikrodiluce 24h	0,8222	0,5371	-0,4805
E-test 24h	0,6098	0,9366	-0,7701
Disk test 24h	-0,3715	-0,6752	0,8690

Amfotericin B	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,7998	-0,2411	-0,1466	0,0000	-0,3083
E-test 24h	0,0583	0,7815	-0,2667	0,0000	0,4329
Disk test 24h	-0,1664	-0,1686	0,8000	0,0000	0,0124
ATB fungus 24h	0,0450	0,2026	0,1633	0,0000	0,3200

Flucytosin	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8164	0,1061	-0,6474	0,5702	0,7523
E-test 24h	0,3761	0,6457	-0,5443	0,4517	0,6220
Disk test 24h	-0,7046	-0,2540	0,8935	-0,4755	-0,6565
ATB fungus 24h	0,6890	0,3510	-0,6435	0,7431	0,9986

Tabulka 45. Spearmanovy korelační koeficienty 24 h vs. 48 h pro *Sachcaromyces cerevisiae* (n = 10), *Blastoschizomyces capitatus* (n = 7) a *Trichosporon* sp. (n = 7)

Flukonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8020	0,5245	-0,5333	0,2364	0,4760
E-test 24h	0,5800	0,8635	-0,7028	0,1425	0,3476
Disk test 24h	-0,5314	-0,7621	0,9060	-0,3120	-0,6246
ATB fungus 24h	0,4321	0,4115	-0,3736	0,1871	0,7410

Itrakonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,7874	0,7238	-0,4029	0,5407	0,5458
E-test 24h	0,5000	0,9334	-0,5800	0,4658	0,6720
Disk test 24h	-0,2400	-0,5960	0,9493	-0,2829	-0,6072
ATB fungus 24h	0,3777	0,6542	-0,5559	0,3040	0,8274

Ketokonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h
Mikrodiluce 24h	0,5847	0,4893	-0,1134	0,5999
E-test 24h	0,1848	0,8160	-0,4887	0,1133
Disk test 24h	-0,0685	-0,2553	0,7355	-0,1867

Vorikonazol	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h
Mikrodiluce 24h	0,8087	-0,0267	0,3341
E-test 24h	0,3199	0,7988	-0,5755
Disk test 24h	0,3237	-0,8345	0,9248

Amfotericin B	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8476	0,4858	-0,2017	0,0000	0,3178
E-test 24h	0,1879	0,8635	-0,5399	0,0000	0,6202
Disk test 24h	-0,1122	-0,5749	0,8890	0,0000	-0,4186
ATB fungus 24h	0,0673	0,2819	-0,0766	0,0000	0,5477

Flucytosin	Mikrodil. 48h	E-test 48h	Disk test 48h	Fungitest 48h	ATBfung.48h
Mikrodiluce 24h	0,8322	0,5558	-0,7652	0,9158	0,9186
E-test 24h	0,5687	0,8578	-0,6239	0,7398	0,7442
Disk test 24h	-0,7696	-0,6173	0,9280	-0,7969	-0,7961
ATB fungus 24h	0,8454	0,7029	-0,8008	0,9932	0,9943